

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Diseño, purificación y caracterización de  
variantes de la retrotranscriptasa del virus de la  
inmunodeficiencia humana tipo 1 de interés  
biotecnológico**

**TESIS DOCTORAL**

Verónica Barrioluengo Fernández

Madrid, 2013

Memoria presentada por la Lda. Verónica Barrioluengo Fernández  
para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad  
Autónoma de Madrid.

Madrid, Septiembre, 2013

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (C.S.I.C.-U.A.M.), bajo la dirección del Dr. Luis Menéndez Arias, con financiación por parte del Ministerio de Educación y Ciencia (beca Predoctoral del Formación de Personal Investigador (FPI asociada al proyecto BIO2007-60319).

## ABREVIATURAS

AMV	Virus de la mieloblastosis de aves
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ASV	Virus del sarcoma de aves
BLV	Virus de la leucemia bovina
BSA	Seroalbúmina bovina
CA	Proteína de la cápsida (p24, en el VIH-1)
CAEV	Virus de la encefalitis artrítica de cabra
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CFRs	Formas recombinantes circulantes
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
ddATP	2',3'-didesoxiadenosina-5'-trifosfato
ddCTP	2',3'-didesoxicitidina-5'-trifosfato
ddGTP	2',3'-didesoxiguanosina-5'-trifosfato
ddTTP	2',3'-didesoxitimidina-5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	2'-desoxirribonucleósido-5'-trifosfato
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena doble
DTT	Ditiotreitol
dTTP	2'-didesoxitimidina-5'-trifosfato
EDTA	Etilendiaminotetraacetato sódico
EIAV	Virus de la anemia infecciosa equina
FIV	Virus de la inmunodeficiencia felina
HTLV-I	Virus de la leucemia humana de células T de tipo I
HTLV-II	Virus de la leucemia humana de células T de tipo II
IN	Integrasa
IPTG	Isopropil-β-D-tio-galactopiranósido
<i>lacZ</i>	Gen que codifica para la β-galactosidasa
LTRs	"Long terminal repeat", secuencia terminal repetida larga
MA	Proteína de la matriz (p17, en el VIH-1)
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio (catión)

MMTV	Virus del tumor mamario de ratón
MLV	Virus de la leucemia de ratón
Mo-MLV	Virus Moloney de la leucemia de ratón
MPMV	Virus Mason-Pfizer de monos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NC	Proteína de la nucleocáptida (p7, en el VIH-1)
NNRTI	Inhibidor de la RT no análogo a nucleósido
NRTI	Inhibidor de la RT análogo a nucleósido
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	Proteasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa H	Ribonucleasa H
RSV	Virus del sarcoma de Rous
RT	Retrotranscriptasa o transcriptasa inversa
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia humana
SIV	Virus de la inmunodeficiencia de simios
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
SU	Glicoproteína de superficie (gp120, en el VIH-1)
TM	Glicoproteína transmembranal (gp41, en el VIH-1)
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
VIH-2	Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2
VISNA	Virus Visna
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido
XMRV	Virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia de ratón

## **NOMENCLATURA DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS**

**A** (Ala) Alanina

**C** (Cys) Cisteína

**D** (Asp) Ácido Aspártico

**E** (Glu) Ácido glutámico

**F** (Phe) Fenilalanina

**G** (Gly) Glicina

**H** (His) Histidina

**I** (Ile) Isoleucina

**K** (Lys) Lisina

**L** (Leu) Leucina

**M** (Met) Metionina

**N** (Asn) Asparagina

**P** (Pro) Prolina

**Q** (Gln) Glutamina

**R** (Arg) Arginina

**S** (Ser) Serina

**T** (Thr) Treonina

**V** (Val) Valina

**W** (Trp) Triptófano

**Y** (Tyr) Tirosina

## ÍNDICE

<b>SUMMARY (Resumen en inglés)</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. Los retrovirus y sus características	3
1.2. Virus de la inmunodeficiencia humana	3
1.3. Ciclo del VIH	6
1.4. Características generales de las RTs de retrovirus	8
1.4.1. Las RTs del VIH-1 y del VIH-2	10
1.4.2. Las RTs del AMV y del ASV	14
1.4.3. Las RTs del MLV y del XMRV	14
1.5. Diversidad del VIH-1	15
1.6. Termoestabilidad	17
1.6.1. DNA polimerasas dependientes de DNA en técnicas de PCR	18
1.6.2. DNA polimerasas dependientes de DNA con actividad polimerasa dependiente de molde RNA	19
1.6.3. RTs en técnicas de PCR	20
1.7. Fidelidad de copia de la RT	23
1.7.1. Métodos experimentales para la estimación de la fidelidad de copia	24
1.7.2. Bases moleculares de la fidelidad de copia de la RT del VIH-1	29
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1. Descripción de las RTs utilizadas	37
3.2. Clonación de la región codificante de las RTs	37
3.3. Mutagénesis dirigida	40

<b>3.4. Purificación de RTs</b>	<b>41</b>
<b>3.4.1. Expresión y purificación de RTs del VIH-1</b>	<b>41</b>
3.4.1.1. Expresión del heterodímero p66/p51 de la RT	41
3.4.1.2. Lisis celular	42
3.4.1.3. Cromatografía de intercambio iónico	42
3.4.1.4. Cromatografía de afinidad	43
<b>3.4.2. Expresión y purificación de la RT del MLV</b>	<b>43</b>
3.4.2.1. Expresión de la RT del MLV	43
3.4.2.2. Lisis celular	44
3.4.2.3. Cromatografía de afinidad	44
3.4.2.4. Cromatografía de intercambio iónico	44
<b>3.4.3. Análisis de pureza y determinación de la concentración de las enzimas</b>	<b>45</b>
<b>3.5. Preparación de complejos heteropoliméricos</b>	<b>45</b>
<b>3.6. Determinación de la concentración de enzima activa</b>	<b>46</b>
<b>3.7. Ensayos de extensión de iniciadores en ausencia de un dNTP</b>	<b>47</b>
<b>3.8. Ensayos cinéticos en el estado pre-estacionario para la determinación de la fidelidad de copia</b>	<b>48</b>
3.8.1. Incorporación del dNTP correcto	48
3.8.2. Incorporación de dNTPs incorrectos	50
3.8.3. Extensión de extremos desapareados	51
<b>3.9. Procesividad</b>	<b>52</b>
<b>3.10. Determinación de la actividad de la RT a distintas temperaturas usando sustratos homopoliméricos</b>	<b>52</b>
<b>3.11. RT-PCR a distintas temperaturas</b>	<b>53</b>
<b>3.12. Ensayos genéticos</b>	<b>54</b>
3.12.1. Ensayo genético para la determinación de la fidelidad de síntesis de DNA utilizando DNA como molde	55



3.12.1.1.	Preparación del “gapped DNA”	55
3.12.1.2.	Reacción de síntesis de DNA (rellenado del “gap”)	56
3.12.1.3.	Preparación de células competentes	56
3.12.1.4.	Electroporación y plaqueo	56
3.12.1.5.	Selección de mutantes y análisis de mutaciones	57
<b>3.12.2.</b>	<b>Ensayo genético para la determinación de fidelidad de síntesis de DNA utilizando como molde RNA</b>	<b>59</b>
3.12.2.1.	Construcción del molde RNA	59
3.12.2.2.	Síntesis de cDNA	59
3.12.2.3.	Fosforilación e hibridación	60
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>63</b>
<b>4.1.</b>	<b>Estudio comparado de las RTs de oncorretrovirus (XMRV y MLV) y del virus de la inmunodeficiencia humana</b>	<b>63</b>
4.1.1.	Estudio de la actividad DNA polimerasa dependiente de DNA en ensayos de incorporación de nucleótidos correctos llevados a cabo en condiciones de estado pre-estacionario	63
4.1.2.	Fidelidad de síntesis de DNA determinado a partir de los parámetros cinéticos obtenidos en condiciones de estado pre-estacionario	66
4.1.2.1.	Discriminación entre dNTPs correctos e incorrectos	67
4.1.2.2.	Extensión de complejos molde-iniciador con extremos desapareados	67
4.1.3.	Determinación de la fidelidad de copia dependiente de molde DNA mediante ensayos genéticos de introducción de mutaciones	69
<b>4.2.</b>	<b>Selección de cambios de aminoácido que introducidos en el contexto de secuencia de la RT del VIH-1 de grupo O podrían mejorar su fidelidad de copia</b>	<b>78</b>
<b>4.3.</b>	<b>Estudio de la estabilidad de las variantes de la RT del VIH-1 de grupo O en función de la temperatura</b>	<b>80</b>

4.3.1	Análisis de la actividad DNA polimerasa dependiente de molde RNA a distintas temperaturas	80
4.3.2.	Análisis de la eficiencia de síntesis de cDNA a diferentes temperaturas mediante ensayos RT-PCR	82
4.3.3.	Efecto de los cambios K65R, R78A y K65R/V75I en la RT del VIH-1 grupo O sobre su actividad DNA polimerasa	85
4.4.	<b>Análisis de la fidelidad de copia</b>	87
4.4.1.	Efecto de los cambios introducidos en la RT del VIH-1 de grupo O sobre la fidelidad de copia dependiente de molde DNA en ensayos de exclusión de un nucleótido	87
4.4.2.	Fidelidad de síntesis de DNA determinada a partir de los parámetros cinéticos de incorporación de dNTPs obtenidos en condiciones de estado pre-estacionario	89
4.4.2.1.	Discriminación entre dNTPs correctos e incorrectos	89
4.4.2.2.	Extensión de complejos molde-iniciador con extremos desapareados	92
4.4.3.	Determinación de la fidelidad de copia dependiente de molde DNA mediante ensayos genéticos de introducción de mutaciones	96
4.5.	<b>Estudio de la procesividad de las enzimas de alta fidelidad</b>	104
4.6.	<b>Determinación de la fidelidad de copia dependiente de molde RNA mediante ensayos genéticos de introducción de mutaciones</b>	106
5.	<b>DISCUSIÓN</b>	118
5.1.	<b>Comparación de la fidelidad intrínseca de RTs de oncorretrovirus y del virus de la inmunodeficiencia humana</b>	118
5.2.	<b>Sustitución de aminoácidos en la RT del VIH-1 de grupo O y sus efectos sobre fidelidad y termoestabilidad</b>	124
5.2.1.	Efecto de los cambios K65R, V75I y R78A sobre la estabilidad de la RT del VIH-1 de grupo O a altas temperaturas	126
5.2.2.	Fidelidad de síntesis de DNA dependiente de molde DNA (ensayos cinéticos y ensayos basados en la expresión del gen <i>lacZ</i> )	127

5.2.3.	Fidelidad de síntesis de DNA dependiente de molde RNA	131
6.	CONCLUSIONES	138
7.	BIBLIOGRAFÍA	141

## **SUMMARY (Resumen en inglés)**

Retroviruses are RNA viruses that replicate through a DNA intermediate, in a process catalyzed by the viral reverse transcriptase (RT). Retroviral RTs are multifunctional enzymes with RNA- and DNA-dependent DNA polymerase, endonuclease (RNase H), strand transfer and strand displacement activities, which catalyze the synthesis of proviral DNA using the viral RNA as template. RTs are extensively used in recombinant DNA technology to synthesize cDNA from messenger RNA. However, the presence of secondary structures in RNA templates can limit the efficiency of reverse transcription. This problem can be mitigated by using RTs active at high temperatures. Murine leukemia virus (MLV) RT and avian myeloblastosis virus (AMV) RT are frequently used in biotechnological applications, but their thermal stability is limited. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RTs have higher stability at elevated temperatures, but they are less faithful than the MLV RT. In this Doctoral Thesis we aimed to study fidelity differences between RTs of MLV, xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) and HIV-1 variants, and improve the fidelity of HIV-1 group O RTs by protein engineering.

The fidelity of DNA synthesis of XMRV RT was found to be similar to that shown by the MLV RT. Both oncoretroviral RTs were >13 times more faithful than an HIV-1 group M subtype B RT variant designated as BH10\_WT (wild-type BH10). In M13mp2-based forward mutation assays, the wild-type HIV-1 group O RT (designated as O\_WT RT) showed 2.5-fold increased accuracy in comparison with the BH10\_WT RT. Nevertheless, MLV and XMRV RTs were about 5 to 6 times more faithful than the O\_WT RT.

In this Thesis, we have examined the effects of mutations K65R and R78A on the thermal stability and fidelity of DNA synthesis of HIV-1 group O RT in the presence or absence of V75I. Our results showed that K65R and K65R/V75I do not affect the thermal stability of the enzyme, but increase its accuracy to similar levels as the MLV RT. These HIV-1 group O RT mutants were >9 times more faithful than the O\_WT enzyme as determined in forward mutation assays using a DNA template. Misinsertion and mispair extension kinetic studies revealed that the selection of nucleotides is governed by  $k_{\text{pol}}$  in the case of O\_K65R RT and  $k_{\text{pol}}$  and  $K_d$  in the case of O\_K65R/V75I RT. We have used an M13mp2-based assay to determine the fidelity of RNA-dependent synthesis of DNA. The error rates of wild-type and mutant enzymes were determined. These assays demonstrated that mutations K65R and K65R/V75I increased the fidelity of RNA-dependent DNA polymerization. However, the effects of the mutations were less pronounced than with DNA templates due to the intrinsic error rate of the T7 RNA polymerase used for synthesis of the RNA template.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Los retrovirus y sus características

*Retroviridae* es una amplia y diversa familia de virus que infectan células animales y que se caracteriza por tener como material genético ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla, lineal, no segmentado y de polaridad positiva. Este RNA tiene un tamaño de 7000 a 13000 pares de bases dependiendo del género del virus. Cada partícula viral contiene dos copias del genoma completo. Los retrovirus son virus con envuelta, en la que están presentes proteínas glicosiladas implicadas en el reconocimiento de la célula hospedadora. Las características biológicas distintivas de esta familia de virus son sus propiedades replicativas. Su ciclo vital incluye dos pasos esenciales; (1) una retrotranscripción de su RNA genómico para dar lugar a una doble cadena lineal de ácido desoxirribonucleico (DNA proviral) (Baltimore, 1970; Temin y Mizutani, 1970), y (2) una integración de este DNA proviral en el genoma de la célula hospedadora. Las enzimas víricas responsables de catalizar estas dos etapas del ciclo vital del virus son la retrotranscriptasa (RT) o transcriptasa inversa y la integrasa (IN), respectivamente.

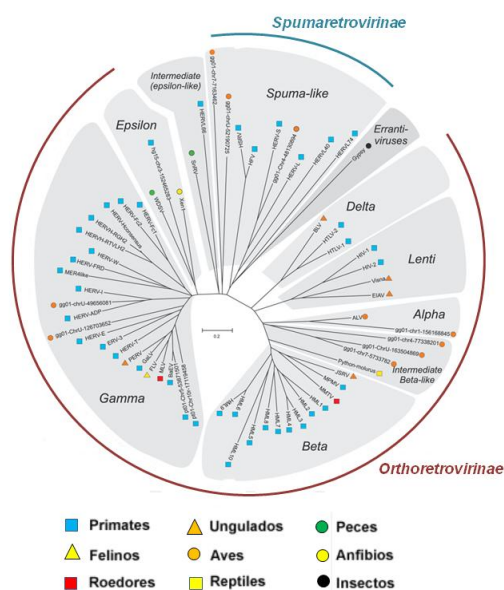
La gran diversidad de la familia *Retroviridae* se representa en la **Figura 1**, donde se muestran las relaciones filogenéticas basadas en la secuencia del gen *pol* (gen que codifica para varias enzimas retrovirales, entre ellas la RT). Además aparecen señaladas las subfamilias, *Orthovirinae* y *Spumavirinae*, en las que se clasifican los retrovirus.

### 1.2. Virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) fue identificado como agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en 1983 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo y Wong-Staal, 1984; Levy *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984). Pertenece al género *Lentivirus*, cuyos miembros se caracterizan por su largo periodo de latencia, lo que retrasa el desarrollo de los signos de la infección que producen.

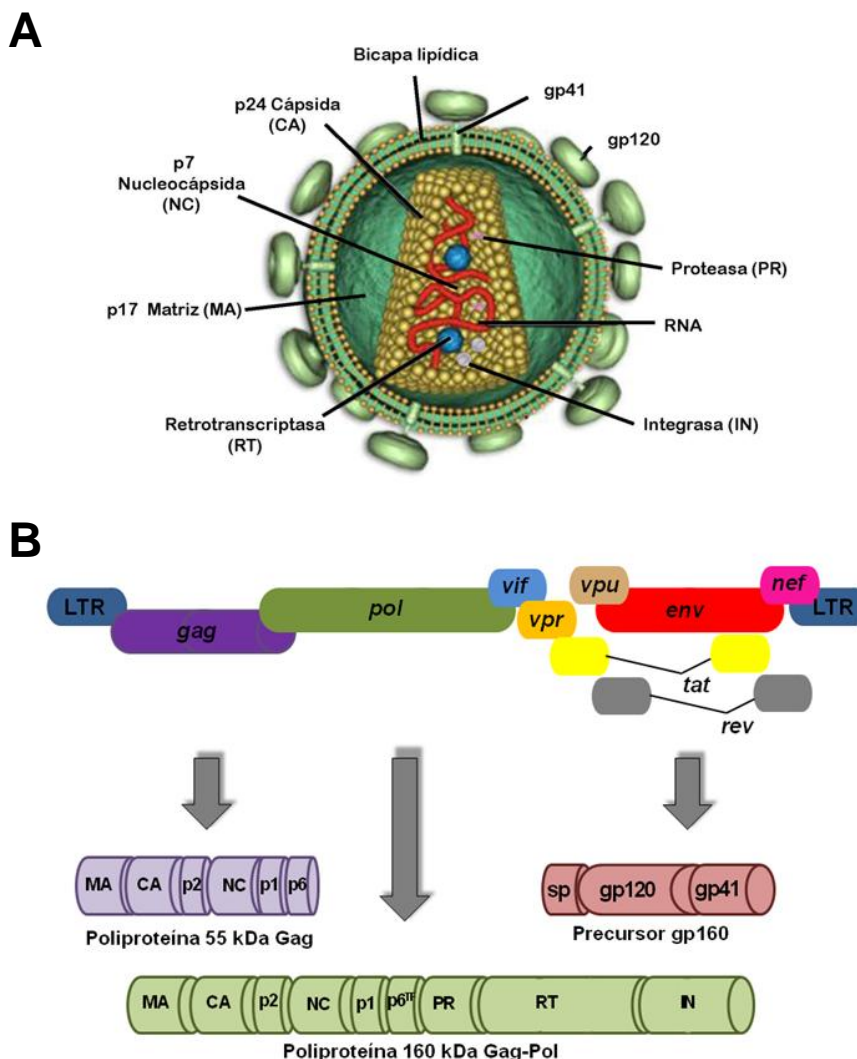
El VIH está rodeado de una envuelta lipídica, derivada de la membrana de la célula hospedadora (**Figura 2A**). En esta envuelta se encuentra una glicoproteína transmembranal (TM, gp41) que mantiene anclada y expuesta al exterior a la glicoproteína de superficie (SU, gp120). En el interior está la proteína de la matriz (MA, p17) y en el centro se localiza la cápsida cónica formada por la proteína CA (p24). El genoma viral se encuentra dentro de esta cápsida. El virus posee dos hebras de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, que se encuentran formando un complejo ribonucleoproteico junto con la proteína de la nucleocápsida (NC, p7). La RT, la IN y la

proteasa (PR) son enzimas que intervienen en distintas etapas del ciclo viral. Además de estas tres enzimas que se han destacado por su importante papel en el ciclo del virus, existen otras proteínas accesorias y reguladoras del virus tales como Rev, Tat, Vpu, Vif, Vpr y Nef que funcionan cuando éste ha infectado la célula. Algunas de ellas se encuentran empaquetadas dentro del virión, como por ejemplo Vif (Turner y Summers, 1999; Adamson y Freed, 2007)



**Figura 1: Representación en dendrograma de las relaciones filogenéticas entre los retrovirus.** Está basado en las secuencias del gen *pol* de los siete géneros de retrovirus (*Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* y *Spumaretrovirus*). Adaptado de Jern *et al.* (2005).

El genoma del VIH tipo 1 (VIH-1) está formado por una cadena de RNA de 9,8 kb. En su forma proviral (**Figura 2B**) posee en sus extremos 3' y 5' dos zonas repetitivas o LTRs ("long terminal repeats"), formadas por las regiones U3 ("unique" 3'), R ("repeat") y U5 ("unique" 5'). Estas zonas son las responsables del inicio de la transcripción y de la poliadenilación del RNA mensajero viral (Kilareski *et al.*, 2009). El genoma viral presenta tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), tres genes reguladores (*tat*, *rev* y *nef*) y tres accesorios (*vif*, *vpr* y *vpu*). Presenta nueve marcos de lectura abiertos, tres de los cuales codifican para las poliproteínas Gag, Pol (que se expresa como Gag-Pol) y Env. Las dos proteínas de la envuelta, es decir, la glicoproteína de superficie (gp120) y la glicoproteína transmembranal (gp41) son codificadas por el gen *env*. Ambas se originan a partir de un mismo precursor de 160 kDa (Env, gp160), que una vez procesado por proteasas celulares da lugar a dos glicoproteínas gp120 y gp41 (Prabakaran *et al.*, 2007).



**Figura 2. Estructura y organización génica del VIH-1. (A)** Estructura del virión de VIH-1. Aparecen señaladas las proteínas que se localizan en la partícula vírica. Figura adaptada de Lodish *et al.* (2000). **(B)** Representación esquemática del genoma proviral del VIH-1, su organización y los productos proteicos a los que da lugar. En los extremos del DNA proviral se encuentran las zonas correspondientes a las secuencias repetidas largas o LTRs. También aparecen representados los genes que codifican para proteínas estructurales y enzimas víricas (*gag*, *pol* y *env*) y los genes que codifican para las proteínas reguladoras (*tat*, *rev* y *nef*) y accesorias (*vif*, *vpr* y *vpu*). Por último, se muestran los productos de expresión de los genes *gag*, *pol* y *env*, y las proteínas a las que dan lugar tras su procesamiento llevado a cabo por la proteasa viral (en el caso de Gag y Gag-Pol) y proteasas celulares (en el caso de Env).

El procesamiento por parte de la PR viral del polipéptido Gag da lugar a las proteínas MA, CA, NC y p6, y a dos péptidos espaciadores (p1 y p2). El gen *pol* se expresa junto con *gag* como una proteína de fusión Gag-Pol. Debido a un cambio en la fase de lectura, el ribosoma no reconoce la señal de terminación del gen *gag* y continúa la traducción hasta expresar la poliproteína Gag-Pol que incluye los dos productos de traducción de los genes *gag* y *pol*. Este hecho se da con una frecuencia del 5%, por lo que las proteínas codificadas por el gen *pol* están en una proporción aproximada de 1:20 con respecto a las del gen *gag* (Jacks *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1988). El precursor Gag-



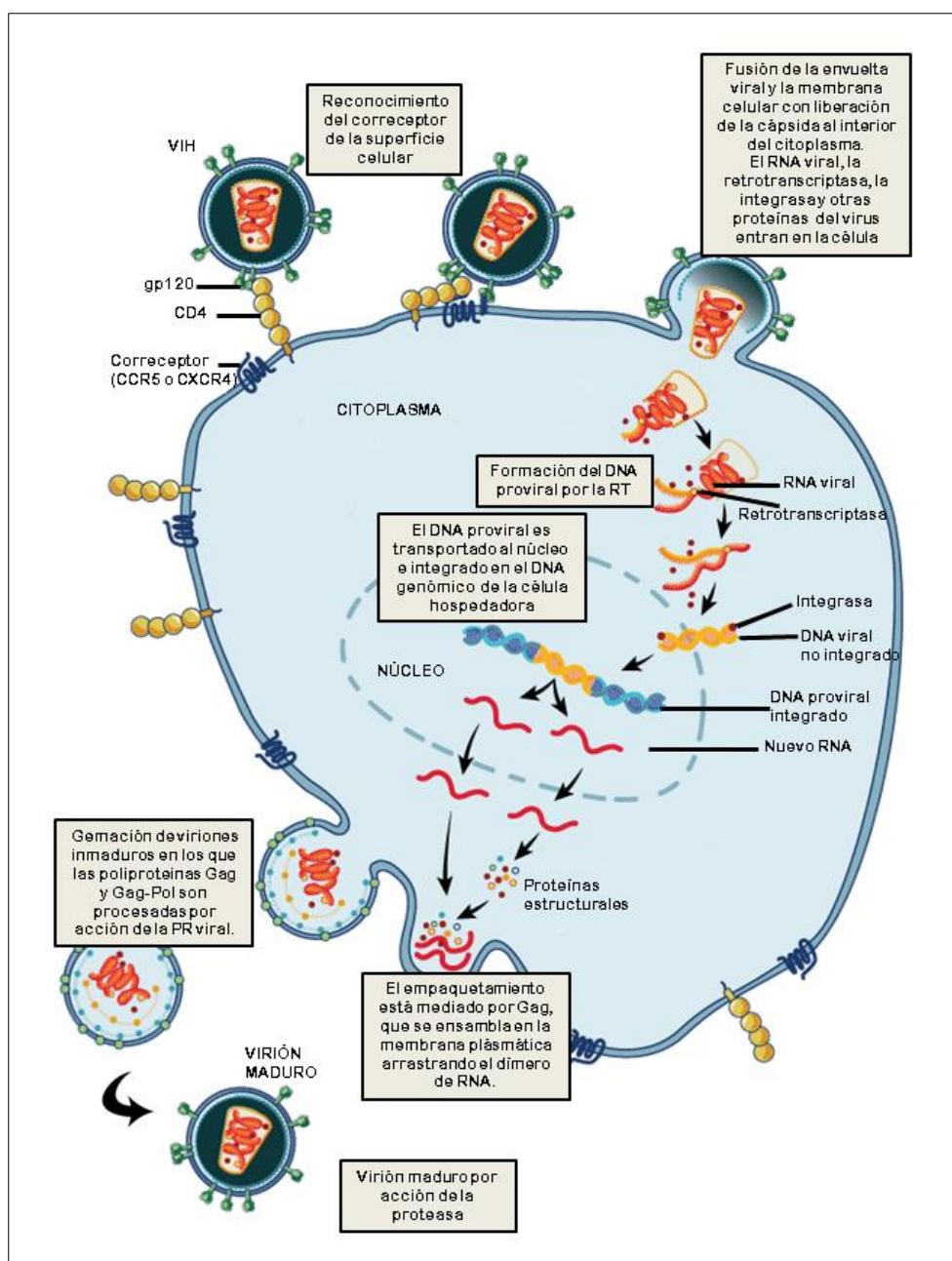
Pol se procesa dando lugar a proteínas estructurales del virus (MA, CA y NC), a p1, p2, p6<sup>TF</sup> y a las enzimas virales PR, RT e IN.

### 1.3. Ciclo del VIH

La entrada del VIH, primer paso del ciclo vital del virus (**Figura 3**), comienza con la adhesión del virus a la célula hospedadora y termina con la fusión de la membrana celular y la envuelta viral con la consecuente entrada del material genético del virus en el citoplasma de la célula hospedadora. La infección comienza con una etapa de fijación gracias a la interacción entre la gp120 y el receptor específico del virus, la proteína CD4 (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984; Yoon *et al.*, 2010), aunque en algunos casos puede haber entrada e infección viral en ausencia de CD4. En general, para que el virus pueda infectar a la célula, no basta con que ésta exprese la proteína CD4, sino que también necesita la expresión de un correceptor perteneciente a la familia de los receptores de quimioquinas, el CCR5 o el CXCR4. El correceptor celular utilizado por el virus determina su tropismo. La mayoría posee un tropismo R5 (es decir, utilizan el correceptor CCR5), aunque hay cepas que pueden usar ambos correceptores, teniendo por tanto un tropismo dual. En menor medida aparece el tropismo X4, usado por una minoría de las cepas del VIH-1 que utilizan el correceptor CXCR4 (Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996; Alkhatib, 2009).

Las células infectadas por el VIH son principalmente linfocitos T CD4+, pero también en menor medida monocitos/macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y células de microglía de cerebro. La replicación viral, por tanto, tiene lugar en diversos tejidos (ganglios linfáticos, intestino, cerebro y timo). Tras el reconocimiento inicial de receptores y correceptores por parte del virus, la glicoproteína gp41 facilita la fusión de la envoltura lipídica del virión y la membrana plasmática de la célula (Wilén *et al.*, 2012).

Una vez en el citoplasma celular, se produce la desencapsulación del virión, que tiene lugar mediante un proceso poco conocido. En el paso de RNA genómico a DNA de doble cadena, la RT sintetiza primero una cadena sencilla de DNA (cadena negativa) usando como molde el RNA, el cual una vez copiado, es degradado por la actividad RNasa H de la enzima. Finalmente la RT sintetiza la cadena positiva del DNA, usando como molde la cadena negativa previamente sintetizada. Este DNA proviral de doble cadena es transportado al núcleo formando un complejo de preintegración, que incluye las proteínas IN, MA, Vpr y probablemente NC. La Vpr es la proteína responsable de dirigir el complejo al núcleo celular (Fouchier *et al.*, 1997; Nie *et al.*, 1998; Rucker *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2009).



**Figura 3. Resumen esquemático del ciclo de replicación viral del VIH-1,** en el que se describen todas las etapas del ciclo, desde el reconocimiento del receptor y la fusión con la célula hasta la producción y salida de los nuevos viriones.

La inserción del provirus en el genoma celular se produce gracias a la acción de la IN del virión (Margolis, 2010). Tras este paso, el virus puede permanecer en un estado latente, siendo necesaria su activación por parte de diversos factores, como pueden ser antígenos, mitógenos o citoquinas entre otros, para que se den los fenómenos de reactivación y replicación (Shaw *et al.*, 1988; Laughlin y Pomerantz, 1994; Quivy *et al.*, 2007; Dahl *et al.*, 2010). El provirus integrado se transcribe por una RNA polimerasa

celular dependiente de DNA (complejo de la RNA polimerasa II) dando lugar a nuevos RNAs que son transportados al citoplasma donde unos se traducen a proteínas virales, mientras que otros dimerizan para formar los RNAs genómicos que son encapsidados en nuevas partículas virales.

Las últimas fases del ciclo incluyen el ensamblaje y la gemación de los nuevos viriones. El empaquetamiento está mediado por la proteína Gag, la cual se ensambla en la membrana plasmática arrastrando el dímero de RNA por sus extremos 5'-UTR (Lu *et al.*, 2011). En el paso de maduración, etapa extracelular del virus, las poliproteínas Gag y Gag-Pol se procesan por la PR permitiendo la formación de la cápsida cónica del virus, resultando en la formación de una partícula viral madura e infecciosa. En cada célula infectada se ensamblan miles de nuevos viriones, pero muchos de ellos están incompletos y no son infecciosos.

#### 1.4. Características generales de las RTs de retrovirus

La RT es una enzima multifuncional, con actividades DNA polimerasa dependiente de RNA y DNA, y actividad endonucleolítica (RNasa H). Además, la RT tiene capacidad de cambio de molde y desplazamiento de cadena (Götte *et al.*, 1999). Esta enzima, a diferencia de otras DNA polimerasas, carece de actividad exonucleolítica y muestra frecuencias de error de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ , valores muy por encima de los obtenidos con DNA polimerasas celulares que, como en el caso de la DNA polimerasa III de *E. coli*, pueden presentar frecuencias de error de  $10^{-9}$ - $10^{-11}$  (Fijalkowska *et al.*, 2012).

Otra peculiaridad de las RTs es su habilidad para cambiar de molde durante el proceso de retrotranscripción. La recombinación se considera la mayor fuente de variabilidad en retrovirus. Gracias a esta capacidad de la RT, el virus consigue reparar genomas defectivos, aumentar su variabilidad y acelerar la distribución de mutaciones beneficiosas. Múltiples variantes pueden infectar una misma célula hospedadora, por lo que RNAs procedentes de distintos virus pueden ser empaquetados finalmente en el mismo virión. Este es un proceso realmente significativo en la producción de nuevas variantes que pueden aportar ventajas selectivas al virus.

Aunque todas las RTs retrovirales poseen secuencias conservadas, tienen actividades similares y derivan del mismo gen viral (*pol*), se diferencian en su tamaño y en la composición de las subunidades que las forman (Herschhorn y Hizi, 2010). En la **Tabla 1** se describen brevemente las características más destacadas de RTs de distintos grupos de retrovirus.

Tabla 1. Composición de subunidades de las RTs de los distintos géneros de retrovirus.

Género	Virus representativos del género	Subunidades	Ref <sup>a</sup>	Características propias
<b>Lentivirus</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1)	66 y 51 kDa	1, 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Heterodímeros</li> <li>- Actividad catalítica de los dominios DNA polimerasa y RNasa H en la subunidad mayor.</li> <li>- Subunidad pequeña con un papel principalmente estructural.</li> </ul>
	Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2 (VIH-2)	68 y 55 kDa	3, 4	
	Virus de la anemia infecciosa equina (EIAV)	66 y 51 kDa	5	
	Virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV)	66 y 51 kDa	6	
<b>Alpharetrovirus</b>	Virus de la mieloblastosis de aves (AMV)	94 y 62 kDa	7, 8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Heterodímeros de gran tamaño.</li> <li>- La subunidad mayor contiene la secuencia de la IN, además de los dominios DNA polimerasa y RNasa H.</li> <li>- Dominios DNA polimerasa y RNasa H en la subunidad pequeña.</li> </ul>
	Virus del sarcoma de aves (ASV)	92 y 63 kDa	9	
<b>Gammaretrovirus</b>	Virus de la leucemia de ratón (MLV)	75 kDa	10, 11	- Monómeros
	Virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia de ratón (XMRV)	72 kDa	12, 13	
<b>Betaretrovirus</b>	Virus del tumor mamario de ratón (MMTV)	66 kDa	14	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Monómeros u homodímeros.</li> <li>- La composición de las subunidades en el virión aún es poco conocida.</li> </ul>
<b>Deltaretrovirus</b>	Virus de la leucemia de células T humanas (HTLV)	95 kDa	15, 16	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El procesamiento por acción de la proteasa deja residuos pertenecientes a la IN en la secuencia de la RT, en el extremo C-terminal de la RNasa H.</li> </ul>
<b>Spumaretrovirus</b>	"Foamy" virus	80/81 kDa	17-21	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No hay precursor Gag-Pol. La RT activa lleva el dominio proteasa en su extremo N-terminal</li> </ul>

<sup>a</sup> (1) Kohlstaedt *et al.*, 1992; (2) Jacobo-Molina *et al.*, 1993; (3) Fan *et al.*, 1995; (4) Fan *et al.*, 1996; (5) Thomas y Furman, 1991; (6) North *et al.*, 1994;; (7) Kacian *et al.*, 1971; (8) Grandgenett *et al.*, 1973; (9) Hizi y Joklik, 1977; (10) Georgiadis *et al.*, 1995; (11) Das y Georgiadis, 2004; (12) Zhou *et al.*, 2012; (13) Kirby *et al.*, 2012; (14) Taube *et al.*, 1998; (15) Rho *et al.*, 1981; (16) Mariani y Shuker, 2003 (17) Liu *et al.*, 1977; (18) Benzair *et al.*, 1982; (19) Leo *et al.*, 2012a; (20) Leo *et al.*, 2012b; (21) Hartl *et al.*, 2010.

El conocimiento actual de la estructura de las RTs está basado principalmente en los datos proporcionados por estructuras cristalográficas de la RT del VIH sola (Esnouf *et al.*, 1995; Rodgers *et al.*, 1995; Hsiou *et al.*, 1996), formando complejos con un molde-iniciador (Jacobo-Molina *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1998; Sarafianos *et al.*, 2001), con DNA y un nucleótido (Huang *et al.*, 1998) o con algún inhibidor (Kohlstaedt *et al.*, 1992; Ding *et al.*, 1995; Sarafianos *et al.*, 2002; Tuske *et al.*, 2004). También se han descrito estructuras cristalográficas de RTs del virus de la leucemia de ratón (MLV), del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2 (VIH-2) y del virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia de ratón (XMRV), aunque algunas son estructuras incompletas (Ren *et al.*, 2002; Das y Georgiadis, 2004; Zhou *et al.*, 2012; Nowak *et al.*, 2013). Estas estructuras revelan la existencia de dos dominios catalíticos comunes para todas las RTs, el dominio DNA polimerasa y el dominio RNasa H, que se encuentran separados por el subdominio “connection”. En los siguientes apartados se realiza una descripción más detallada de la composición, estructura y función de las RTs de los retrovirus mejor caracterizados.

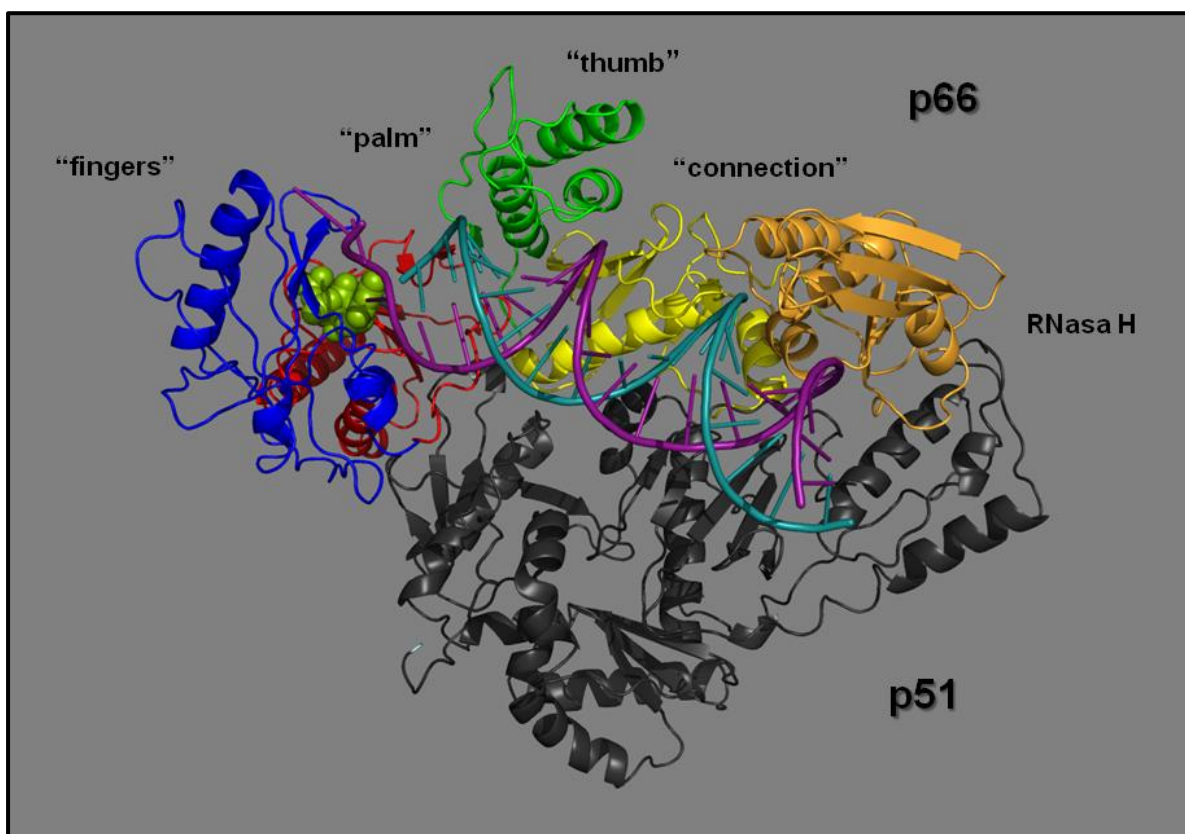
#### 1.4.1. Las RTs del VIH-1 y del VIH-2

Las dos subunidades del heterodímero asimétrico de la RT del VIH-1 comparten la misma secuencia de aminoácidos, aunque p66 consta de 560 residuos, mientras que p51 tan solo tiene 440 aminoácidos como resultado de la acción de la PR que corta entre los aminoácidos 440 y 441 en una de las cadenas que forman la enzima.

La subunidad mayor del heterodímero de la RT, p66, contiene los sitios activos para ambas actividades enzimáticas (DNA polimerasa y RNasa H). La subunidad menor (p51) desempeña principalmente un papel estructural. El dominio polimerasa está a su vez dividido en cuatro subdominios: “fingers” (residuos 1-85 y 118-155), “palm” (residuos 86-117 y 156-236), “thumb” (residuos 237-318) y “connection” (residuos 319-426) (**Figura 4**). La subunidad p51 se compone de los mismos subdominios aunque la cadena esta plegada de forma diferente a la de la subunidad mayor (p66).

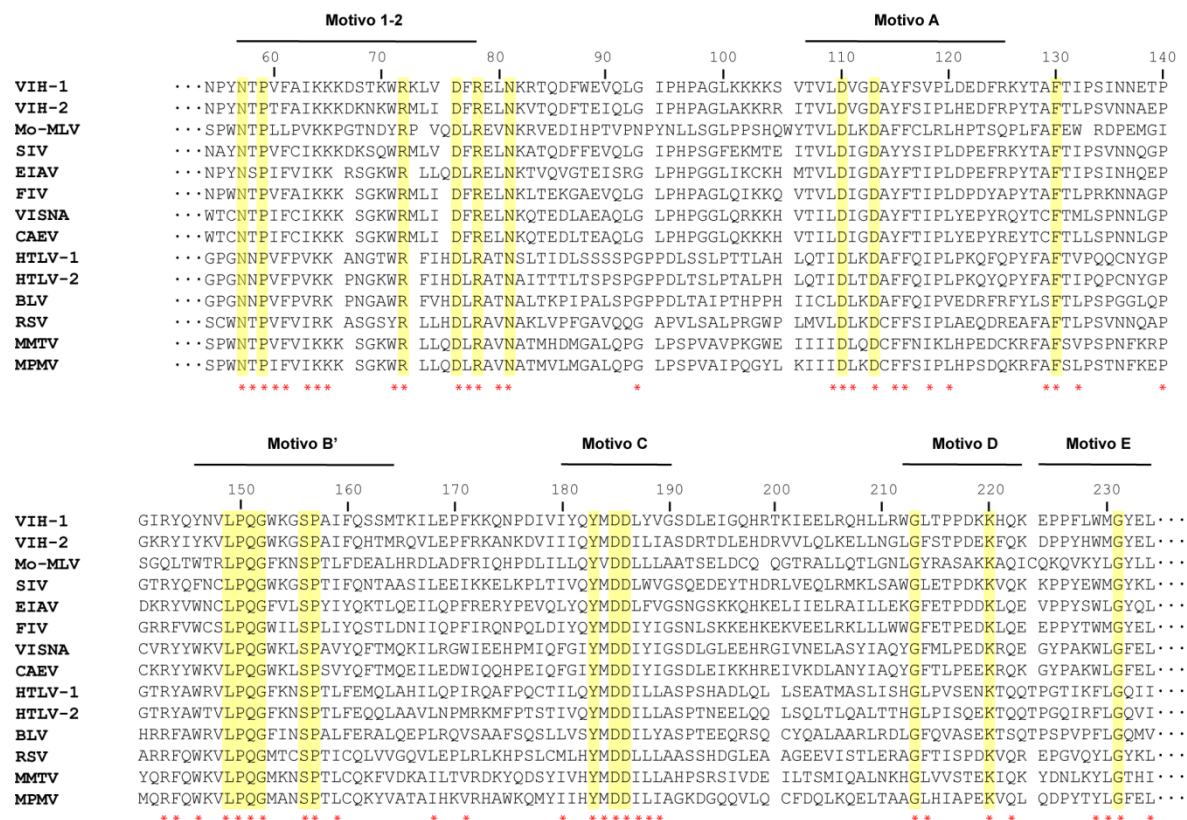
El sitio activo del dominio DNA polimerasa contiene tres carboxilatos catalíticos en el subdominio “palm” de la p66 (Asp110, Asp185 y Asp186). Estos residuos intervienen en la unión de dos cationes divalentes (típicamente  $Mg^{2+}$ ), necesarios para la catálisis. Asp185 y Asp186 son parte del motivo YXDD, que está muy conservado en las RTs de retrovirus (X es Met en el caso de VIH y otros retrovirus, y Val, Leu o Ala en MLV, AMV y otros virus) (**Figura 5**). Otros residuos conservados están implicados en la polimerización de nucleótidos ya que forman parte del sitio de unión del dNTP (**Figura 6**). Así, Lys65 y

Arg72 están involucrados en la unión de los fosfatos  $\gamma$  y  $\beta$ , respectivamente. Tyr115, residuo que contribuye en la unión del anillo desoxirribosa del dNTP entrante, interviene en la discriminación entre desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos trifosfato. Gln151 es un residuo que interacciona directamente con la base nitrogenada del dNTP entrante posicionándolo correctamente.



**Figura 4. Estructura de la RT del VIH-1 formando un complejo con un molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico y con el dNTP entrante (PDB 1RTD) (Huang *et al.*, 1998).** La subunidad p66 aparece representada por distintos colores que indican la parte de la secuencia que corresponde a cada uno de los subdominios presentes en la subunidad. El subdominio “fingers” se representa en azul, “palm” en rojo, “thumb” en verde y “connection” en amarillo. El dominio RNasa H aparece representado en naranja. La subunidad p51 aparece en negro. En el complejo molde-iniciador, la cadena que representa el molde se encuentra representada en color morado y la que forma el iniciador en turquesa. En verde se muestra el nucleótido trifosfato entrante, dTTP. Esta figura se ha realizado utilizando el programa “PyMol” (DeLano Scientific).





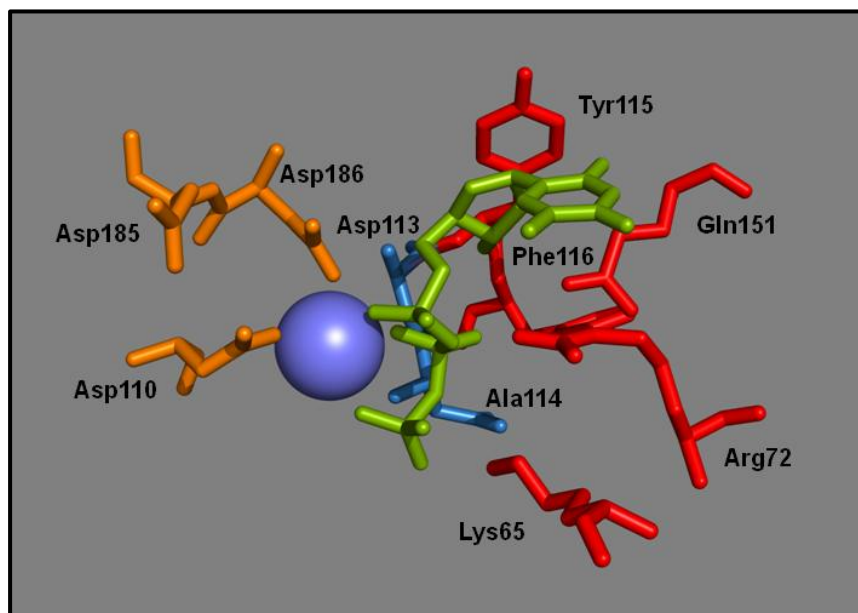
**Figura 5. Alineamientos de secuencias de RTs de retrovirus.** Se muestran los motivos conservados 1-2, A, B', C, D y E del dominio polimerasa. En los motivos A y C es en los que se localizan los residuos catalíticos de este dominio. El motivo B participa en la unión del dNTP gracias a la presencia del residuo Gln151, que forma parte de la secuencia conservada Leu-Pro-Gln-Gly que está en todas las secuencias. El motivo D, es el que presenta mayor variabilidad y está relacionado con la resistencia a fármacos. Por último, el motivo E, se encarga principalmente de posicionar correctamente el extremo del iniciador para que pueda ser sometido a un ataque nucleofílico por parte del dNTP entrante. La numeración corresponde a la secuencia de la RT del VIH-1 colocada en la parte superior del alineamiento. Los aminoácidos conservados en la mayoría de las RTs se indican mediante un asterisco rojo en la parte inferior del alineamiento. Los residuos conservados en todas las RTs se encuentran sombreados en amarillo. Las abreviaturas utilizadas son: VIH-1, virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1; VIH-2, virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2; Mo-MLV, virus Moloney de la leucemia de ratón; SIV, virus de la inmunodeficiencia de simios; EIAV, virus de la anemia infecciosa equina; FIV, virus de la inmunodeficiencia de felinos; VISNA, virus Visna; CAEV, virus de la encefalitis artrítica de cabra; HTLV-1, virus de la leucemia de células T humana de tipo 1; HTLV-2, virus de la leucemia de células T humana de tipo 2; BLV, virus de la leucemia bovina; RSV, virus del sarcoma de Rous; MMTV, virus del tumor mamario de ratón; MPMV, virus Mason-Pfizer de monos.

En el caso del dominio RNasa H también se encuentran dos iones metálicos en su sitio activo, imprescindibles para llevar a cabo la actividad nucleasa. Estos cationes interaccionan con los residuos conservados Asp442, Glu478, Asp498 y Asp549 (DeStefano *et al.*, 1994; Mizrahi *et al.*, 1994)

Los subdominios de la RT adoptan una disposición estructural que se asemeja a una mano derecha abierta, creando una hendidura en la estructura de la enzima en la que interacciona con el ácido nucleico (complejo molde-iniciador). Los componentes de

esta zona de interacción provienen principalmente de p66, con participación de los subdominios “thumb” y “connection” de p51, que forman la base del sitio de interacción. La hendidura donde interacciona el DNA está configurada de tal manera que el ácido nucleico abarca tanto el sitio activo de la polimerasa como el de la RNasa H, separados por unos 17-18 pares de bases (Rausch *et al.*, 2002). Las hélices  $\alpha$ H y  $\alpha$ I del subdominio “thumb” ayudan a posicionar adecuadamente el ácido nucleico en el sitio de unión, a través de interacciones que afectan tanto al iniciador como al molde. También cabe destacar la zona de contacto con el iniciador. Los aminoácidos involucrados forman un motivo estructural muy conservado que se compone de las horquillas  $\beta$ 12 y  $\beta$ 13 de la subunidad p66, y que ayuda a colocar el extremo 3'-OH del iniciador en el sitio activo de la polimerasa. Mutaciones en esta zona muestran cambios en la unión al ácido nucleico y afectan a las actividades DNA polimerasa y RNasa H (Cases-González y Menéndez-Arias, 2004; Dash *et al.*, 2008).

El VIH-2 comparte con el VIH-1 un 60% de identidad de secuencia en *pol* (Herschhorn y Hizi, 2010). A pesar de que el sitio corte en el N-terminal del dominio RNasa H está conservado, el tamaño de la subunidad pequeña aún no se ha determinado con certeza (Ren *et al.*, 2002).



**Figura 6. Interacciones en el sitio de unión del dNTP en la estructura de la RT del VIH-1.** Se muestran los residuos más relevantes para la unión del dNTP, representado en verde. La esfera azul en la zona central del sitio activo representa el átomo del  $Mg^{2+}$  que se coordina con el dNTP. Los residuos representados en naranja (Asp110, Asp185 y Asp 186), son los que forman el sitio activo de la actividad DNA polimerasa. El dNTP interacciona con las cadenas laterales de los residuos Lys65, Arg72, Tyr115, Phe116 y Gln151 (rojo), y con el esqueleto polipeptídico de los residuos Asp113 y Ala114 (azul). La estructura ha sido obtenida del Protein Data Bank (código 1RTD) (Huang *et al.*, 1998). Se ha realizado la figura con el programa “PyMol” (DeLano Scientific).



Tan solo hay un cristal que describe la estructura de esta RT, en el que se observa la subunidad p68 completa (559 residuos) unida a una subunidad menor de 427 aminoácidos debido a la degradación de la p68 por las proteasas celulares de la bacteria donde se expresó la enzima.

#### 1.4.2. Las RTs del AMV y del ASV

Es característico de estas enzimas que en su purificación se obtengan tres isoformas diferentes y activas. La más abundante es un heterodímero que consiste en un polipéptido de 95 kDa, designado subunidad  $\beta$ , el cual tiene fusionado en su extremo C-terminal la secuencia codificante para la IN, y una subunidad menor de 63 kDa denominada subunidad  $\alpha$ , la cual carece de la región IN como resultado de la acción de la PR viral (Perbal, 2008). Las otras formas descritas son un homodímero  $\beta\beta$  y un monómero  $\alpha$ , estas dos últimas se encuentran en una proporción menor a la forma heteropolimérica (Hizi *et al.*, 1977), isoforma representativa de la enzima.

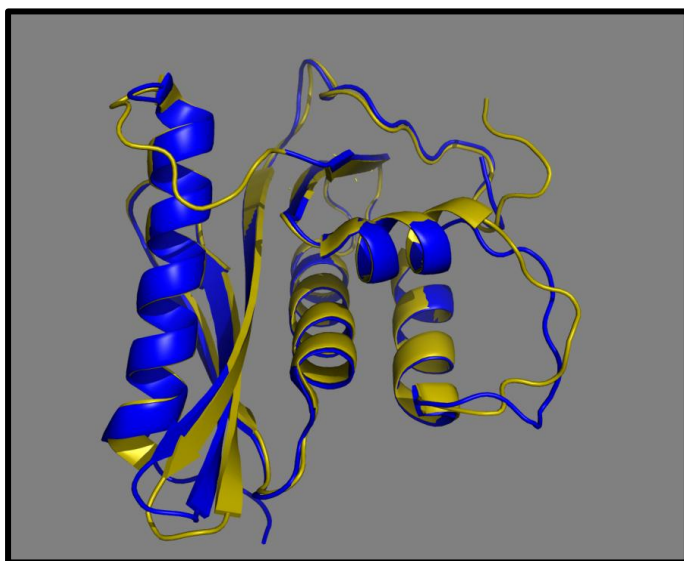
A diferencia de las RTs de lentivirus, estas enzimas poseen el dominio RNasa H en ambas subunidades. Sin embargo, hay estudios que indican que la subunidad portadora de la actividad es la subunidad  $\alpha$  de la enzima (Werner y Wohrl, 2000), al igual que ocurre en las RTs de lentivirus, donde una de las subunidades (la subunidad mayor, p66 o p68) es la que contiene los centros catalíticos para las actividades polimerasa y RNasa H (Hizi y Herschhorn, 2008).

#### 1.4.4. Las RTs del MLV y del XMRV

Aunque la RT del MLV se caracteriza por tener una estructura monomérica de 75 kDa, su estructura es básicamente la misma que la descrita para las demás RTs, es decir, presenta los mismos subdominios (“fingers”, “palm”, “thumb” y “connection”), además del dominio RNasa H en su extremo C-terminal (Das y Georgiadis, 2004; Lim *et al.*, 2006).

Los análisis estructurales muestran que las RTs del VIH-1 y del MLV presentan sus mayores diferencias en los dominios “thumb” y “connection”, mientras que “fingers” y “palm” muestran una identidad significativa con la RT del VIH-1 (Coté y Roth, 2008). La RT del MLV tiene 111 aminoácidos más que la subunidad p66 de VIH-1. Las diferencias más relevantes entre ambas RTs se observan en el extremo N-terminal, que tiene 40 residuos más en la enzima de MLV, y también entre el subdominio “connection” y el dominio RNasa H donde esta RT presenta 32 aminoácidos adicionales.

Por último, la RT de un virus recientemente descrito, el virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia de ratón (XMRV) muestra un 97,5% de identidad con la RT del MLV (Kim *et al.*, 2012; Kirby *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012, Nowak *et al.*, 2013), compartiendo la posición de los aspárticos de su centro activo (Asp150, Asp224 y Asp225). A pesar de su similitud, las RTs de MLV y XMRV muestran algunas diferencias en su región C-terminal, que contiene el dominio RNasa H (**Figura 7**).



**Figura 7. Comparación de la estructura cristalográfica del dominio RNasa H de las RTs del MLV (PDB 2HB5) y del XMRV (PDB 3V1Q).** Superposición de las estructuras de la RNasa H del MLV (azul) y del XMRV (amarillo). Se ha realizado la figura con el programa "PyMol" (DeLano Scientific)

## 1.5. Diversidad del VIH

En el caso particular del VIH, la producción de viriones diarios en un individuo infectado es de  $10^{10}$  y su RT se caracteriza por una tasa de mutación de 1 cambio por cada 10000 bases aproximadamente (Pathak y Temin, 1990). Desde su expansión inicial en humanos hace más de siete décadas en África, el virus ha acumulado un extraordinario número de cambios. Su diversidad genética se manifiesta en la amplia distribución del virus en numerosos linajes. El VIH se clasifica actualmente en dos tipos: VIH-1 y VIH-2. Dentro del VIH-1 (el más expandido) se diferencian 4 grupos filogenéticos: M ("main"), O ("outlier"), N ("non-M, non-O") y P (Buonaguro *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2008; Plantier *et al.*, 2009) (**Figura 8**). La mayoría de las infecciones son causadas por virus del grupo M, el cual está dividido en 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J y K), ampliamente distribuidos por todo el mundo (Taylor y Hammer, 2008; Eberle y Gurtler, 2012). Además, se han descrito recombinaciones entre virus de distintos subtipos que han dado lugar a formas recombinantes circulantes (CFRs), de las que hoy en día se conocen 49 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). Se

identifican por el número correspondiente al orden en el que fueron descritas, seguido de las letras de los subtipos parentales de los que proceden o por cpx si están originadas a partir de más de tres subtipos diferentes.

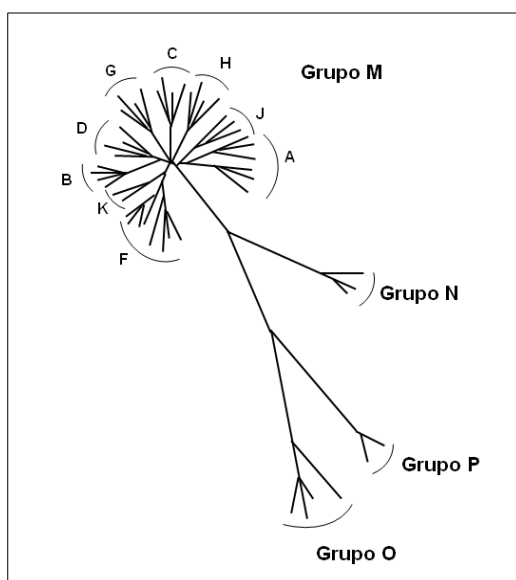
El subtipo B del grupo M abarca los primeros aislados identificados del virus, descritos en los años 80. Además son los más extendidos en Europa occidental y América (Hemelaar *et al.*, 2011). Por ello, la mayoría de los estudios virológicos y las caracterizaciones de las proteínas del virus se han realizado con cepas de referencia de subtipo B. A pesar de todo, otros grupos y subtipos han tomado verdadera relevancia en los últimos años debido a que se ha producido un incremento en la prevalencia de subtipos no-B en infecciones causadas por el VIH en los países desarrollados (Ciccozzi *et al.*, 2012).

Entre los virus que han cobrado interés está el VIH-1 de grupo O. El primer aislado de este virus se describió en 1987 y se obtuvo de dos cameruneses residentes en Bélgica. Se publicó una secuencia de nucleótidos parcial tres años más tarde (De Leys *et al.*, 1990). Los datos epidemiológicos muestran que estos virus están ampliamente distribuidos por Camerún y probablemente por sus países vecinos, Gabón y Nigeria (Kabeya *et al.*, 1995; Delaporte *et al.*, 1996; Mauclore *et al.*, 1997; Peeters *et al.*, 1997). En estos países se encuentra un mayor número de infecciones producidas por virus de este grupo que por virus clasificados como de grupo M. Su prevalencia ha sido estimada en alrededor de un 6-8% del total de personas infectadas con el VIH en las zonas urbanas de Camerún. Además, también se han identificado infecciones del VIH-1 de grupo O en otros países del oeste y sur de África (Heyndrickx *et al.*, 1996), además de Europa (Hampl *et al.*, 1995; Loussert-Ajaka *et al.*, 1995; Soriano *et al.*, 1996) y Estados Unidos (Gould *et al.*, 1996). El primer caso conocido de una infección en Europa, se describió en un paciente sin ningún contacto con países en los que esta cepa vírica tiene su mayor prevalencia (países de África occidental) y afectó a una mujer caucásica francesa (Charneau *et al.*, 1994).

Los análisis filogenéticos de las cepas de grupo O muestran que están alejadas de otros grupos e igual de próximas al grupo M de VIH-1 que al VIH-2. Los tests convencionales de identificación de individuos infectados por el VIH no discriminaban si la infección es causada por el VIH-1 de grupo O (Loussert-Ajaka *et al.*, 1994; Schable *et al.*, 1994), lo que ha requerido el desarrollo de técnicas específicas para la identificación de este tipo de infecciones (Depatureaux *et al.*, 2010).

La distancia genética entre la región codificante de la RT de diferentes cepas de VIH-1 de grupo O está entre un 5 y un 10%, mientras que si comparamos cepas del

grupo O con el grupo M encontramos una diferencia del 31 al 34% en su secuencia de nucleótidos (Tebit *et al.*, 2010). En la comparación de las RTs de grupo M subtipo B y grupo O se observa una diferencia de un 15% en su secuencia completa de aminoácidos, sin embargo, destaca la mayor divergencia evolutiva del dominio RNasa H, en la cual las diferencias representan un 28%. Esta discrepancia se incrementa cuando se compara la región comprendida entre los aminoácidos 460-483 donde la homología es de tan solo un 50% (Quiñones-Mateu *et al.*, 1997). En el dominio DNA polimerasa también se observan diferencias, aunque menores. Las RTs de grupo O son resistentes a los inhibidores de la RT no análogos a nucleósido (Descamps *et al.*, 1995; Domingo *et al.*, 1997; Quiñones-Mateu *et al.*, 1997; Rodes *et al.*, 2005; Tebit *et al.*, 2010). Esto se debe a que la mayoría de estas enzimas contiene Gly98, Glu179 y Cys181 en lugar de Ala98, Val179 y Tyr181, respectivamente, como sucede en las RTs de grupo M subtipo B.



**Figura 8. Árbol filogenético de los grupos y subtipos del VIH-1.** Filogenia derivada del análisis del gen *pol* del VIH-1 de los siguientes aislados: Subtipo A: DQ676872, AB253421, AB253429, AF286238, GU201516 y AF286237. Subtipo B: AY423387, AY331295, AY173951 y K03455 (HXB2). Subtipo C: U46016, AF067155 y AY772699. Subtipo D: U88824, AY253311, AY371157 y K03454. Subtipo F: AF377956, AY371158, AJ249237, AJ249236, AJ249238, AF005494, AF075703, AF077336. Subtipo G: AY612637, AF061641, U88826, AF084936. Subtipo H: AF190127, AF190128, AF005496, FJ711703. Subtipo J: EF614151, GU237072, AF082394. Subtipo K: AJ249239, AJ249235. Grupo N: AJ006022, AJ271370, AY532635. Grupo P: HQ179987, GU111555. Grupo O: L20571 (MVP5180), AY169812, L20587 (ANT70), AJ302647. Secuencias recogidas en <http://hiv.lanl.gov/content/sequence/NEUALIGN/align.html>. Figura adaptada de Menéndez-Arias (2013).

## 1.6. Termoestabilidad

La capacidad de las DNA polimerasas para replicar hebras de DNA se utiliza en las técnicas de amplificación (PCR). Para ello se requieren polimerasas que soporten altas temperaturas, ya que es necesario desnaturalizar el DNA para sintetizar las nuevas hebras de DNA y por tanto aumentar la cantidad de producto.

### 1.6.1. DNA polimerasas dependientes de DNA en técnicas de PCR

La DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), es la enzima habitualmente utilizada en las técnicas de amplificación por PCR, debido a su alta termoestabilidad. Su mayor inconveniente es su baja fidelidad y su carencia de actividad exonucleasa correctora de errores. Por ello se han obtenido otras polimerasas de bacterias termófilas o arqueobacterias, como las DNA polimerasas de *Pyrococcus furiosus* (Pfu polimerasa) (Klimezak *et al.*, 1986), de *Thermatoga marítima* (Tma polimerasa) (Palm *et al.*, 1993) y de *Pyrococcus woesei* (Pwo polimerasa) (Baumann y Jackson, 1996) que sí poseen actividad correctora de errores. Son enzimas con alta termoestabilidad, y fidelidad de copia pero solo pueden usar como molde DNA (Tabla 2).

**Tabla 2. DNA polimerasas dependientes de molde DNA obtenidas de bacterias termófilas y arqueobacterias.**

Enzima	Fuente	Tamaño molecular	T <sub>1/2</sub> <sup>a</sup> (95°C)	Características	Referencias
<b>Actividad correctora:</b>					
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	94 kDa	40 min	5'→3' exo	Chien, 1976
<b>Tasa de error:</b>					
2×10 <sup>-5</sup> -1×10 <sup>-4</sup>					
<b>Velocidad de polimerización:</b>					
Tfl	<i>Thermus flavus</i>	94 kDa	40 min	35-100 nt/s	Kaledin <i>et al.</i> , 1981
<b>Procesividad:</b>					
30-60 Kb					
<b>Enzimas con alta fidelidad</b>					
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	92 kDa	2 h	<b>Actividad correctora:</b> 5'→3' exo	Klimezak <i>et al.</i> , 1986 Lu y Erickson, 1997
Vent	<i>Thermococcus litoralis</i>	90-95 kDa	7 h	3'→5' exo	Mattila <i>et al.</i> , 1991
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>	90 kDa	2 h	<b>Tasa de error:</b> 0,66-1,6×10 <sup>-6</sup>	Baumann y Jackson, 1996
Tma	<i>Thermatoga marítima</i>	70 kDa	50 min	<b>Velocidad de polimerización:</b>	Palm <i>et al.</i> , 1993
Psp	<i>Pyrococcus sp GB-D</i>	91 kDa	3,5 h	≈50nt/s	Barnes, 1994
Pab	<i>Pyrococcus abyssi</i>	85 kDa	5 h	<b>Procesividad:</b> 3,5-7 Kba	Lundberg <i>et al.</i> , 1991 Robb <i>et al.</i> , 2001

<sup>a</sup> T<sub>1/2</sub>: Vida media de la enzima a 95°C.

### 1.6.2. DNA polimerasas dependientes de DNA con actividad polimerasa dependiente de molde RNA

Por otro lado, la síntesis de fragmentos largos de cDNA *in vitro* se puede considerar la segunda técnica más importante en biología molecular, después de la PCR, y en ella es necesario retrotranscribir el RNA molde. Para ello se hacen imprescindibles DNA polimerasas que puedan sintetizar DNA a partir de moldes RNA.

La mayoría de los protocolos de RT-PCR requieren dos DNA polimerasas, una RT para sintetizar cDNA a partir de RNA y una polimerasa termoestable para la etapa de amplificación. La limitación impuesta por la introducción de dos etapas en la reacción se ha intentado solventar usando DNA polimerasas dependientes de molde DNA termoestables, sobre las que se han realizado cambios que reducen su selectividad por el molde. Un interesante trabajo publicado en 2006 muestra una serie de mutantes realizados sobre la DNA polimerasa KlenTaq (enzima suministrada por varias empresas como Sigma, New England Biolabs o Clontech). Entre ellos se describe un mutante con una actividad DNA polimerasa dependiente de molde RNA 40 veces más eficiente que la que muestra la enzima WT. Esta polimerasa es capaz de sintetizar cDNA a 63-68°C y amplificarlo posteriormente (Sauter y Marx, 2006). Sin embargo, la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA no es muy buena, ya que en estudios posteriores se destaca su baja procesividad y sensibilidad, lo que limita su uso a la obtención de cDNAs cortos y muestras con una alta concentración de molde, características poco comunes en muestras biológicas (Kranaster *et al.*, 2010). También se han descrito mutaciones en una DNA polimerasa dependiente de DNA de *Thermatoga petrophila* que alteran su capacidad de discriminación entre DNA y RNA por interferencia estérica con el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa. Los residuos implicados se localizan en el dominio de la actividad 3'→5' exonucleasa. Las mutaciones realizadas facilitan la unión del RNA, ya que se produce un aumento del espacio de unión en el sitio activo debido a que la enzima mutante porta residuos con cadenas laterales más cortas que la enzima "wild type" (Sano *et al.*, 2012).

Entre las DNA polimerasas virales encontramos enzimas altamente procesivas, como las de los bacteriófagos T5, T7 o Φ29, y otras que muestran una alta fidelidad de copia como la del fago T4. Sin embargo, a pesar de su indudable utilidad en técnicas de biología molecular no pueden ser utilizadas en técnicas de amplificación a altas temperaturas. Se ha descrito una enzima perteneciente a una familia no definida taxonómicamente de polimerasas virales altamente termoestables, con una gran similitud en su secuencia de aminoácidos con la polimerasa de tipo I de la familia *Aquificales*. A esta enzima se le ha eliminado su actividad 5'→3' exonucleasa para eliminar su

discriminación por los moldes DNA, y que es capaz de mantener una actividad polimerasa a 65°C, lo que le aporta la capacidad de realizar la síntesis a una mayor temperatura (Moser *et al.*, 2012). Los inconvenientes de esta polimerasa son que su procesividad es notablemente menor a la descrita para RTs de retrovirus, que consiguen sintetizar fragmentos de hasta 1000 pb. Otro de sus puntos débiles son sus 11 minutos de vida media ( $T_{1/2}$ ) a 94°C, en comparación con las 2 h que resiste la Taq polimerasa manteniendo su actividad a dicha temperatura.

### 1.6.3. RTs en técnicas de PCR

Las RTs tienen actividad polimerasa dependiente de RNA y DNA, lo que hace que sean enzimas útiles para la síntesis de DNA usando como molde RNA. Sin embargo, no son enzimas lo suficientemente estables en ciertas condiciones, lo que restringe su uso en algunas aplicaciones biotecnológicas. Se debe entender la estabilidad de una enzima como su capacidad para mantener su actividad bajo unas determinadas condiciones. Suelen ser factores limitantes la temperatura y la presencia de algunos compuestos químicos que pueden producir una inactivación permanente de la RT (Gerard *et al.*, 2002; Yasukawa *et al.*, 2010a).

En el proceso de síntesis de cDNA y en la amplificación de zonas específicas de RNA, el uso de una temperatura elevada es recomendable, ya que se desestabilizan y reducen las estructuras secundarias del RNA (Wu *et al.*, 1996; Lanciault y Champoux, 2006) y las uniones inespecíficas de los oligonucleótidos. Incluso se ha demostrado un incremento en la fidelidad de copia a altas temperaturas, debido a que se produce una reducción en la estabilidad de los extremos desapareados impidiendo su extensión y por tanto la incorporación de un nucleótido incorrecto en la secuencia (Malboeuf *et al.*, 2001). Considerando que el RNA es estable a altas temperaturas, una mejora en la estabilidad de la RT es importante para conseguir perfeccionar las técnicas de DNA recombinante, aumentando de este modo la especificidad y la eficiencia de la síntesis y disminuyendo el tiempo de reacción.

Las RTs más utilizadas para este tipo de técnicas son las RTs del MLV y del AMV, debido a que estas enzimas muestran una actividad elevada y una alta fidelidad de copia en la síntesis de DNA. La enzima del MLV se caracteriza por tener una temperatura óptima de reacción de 37-42°C, pero se inactiva rápidamente a altas temperaturas. Por el contrario, la RT del AMV tiene su temperatura óptima en torno a los 45-50°C. Además, se puede mantener activa en reacciones realizadas a 60°C. El problema con este tipo de enzimas es el tiempo de reacción, ya que, en ausencia del complejo molde-iniciador, la actividad de las RTs del MLV y del AMV se reduce al 50% tras incubar 10 min a 44 y

47°C, respectivamente. En presencia de un complejo molde-iniciador, el 50% de actividad se mantiene tras incubaciones de 10 min a 47°C en el caso de la RT del MLV y de 52°C en el caso de la del AMV (Gerard *et al.*, 1997; Yasukawa *et al.*, 2008). Por tanto, las reacciones con estas RTs no son eficaces a temperaturas altas ya que pierden su actividad a lo largo del ensayo.

A pesar de su mayor estabilidad a temperaturas altas, la RT del AMV es menos popular en las técnicas de DNA recombinante debido a que muestra menor procesividad y mayor actividad RNasa H en comparación con la enzima del MLV. Por otro lado, la RT del MLV, al tratarse de una enzima monomérica, se ha considerado la candidata ideal para su mejora por mutagénesis dirigida (Kotewicz *et al.*, 1988; Gerard *et al.*, 2002; Arezi y Hogrefe, 2009; Yasukawa *et al.*, 2010b).

Como resultado de los estudios de mejora de la estabilidad de la enzima, en los últimos años, se han obtenido muchas variantes de la RT del MLV que se usan actualmente en kits comerciales. Desafortunadamente, las características de estas enzimas están descritas en patentes con pocos detalles técnicos (SuperScript II, SuperScript III, AffinityScript, RevertAid Premium...) (**Tabla 3**). Son pocas las variantes descritas en la literatura científica (Gerard *et al.*, 2002; Arezi y Hogrefe, 2009; Baranauskas *et al.*, 2012) que incluyen cambios de aminoácidos que producen un incremento en la afinidad por el complejo molde-iniciador, en su procesividad o que reducen o anulan la actividad RNasa H.

Se han obtenido variantes termoestables de la RT del MLV mediante diseño racional o por cribado de alto rendimiento ("high-throughput screening"). Así, Arezi y Hogrefe (2009) generaron mutantes al azar utilizando el kit GeneMorph®. Obtuvieron  $5 \times 10^4$  clones, conteniendo cada uno de ellos 1-6 mutaciones por kilobase. Se analizó la termoestabilidad a 55°C de 3400 clones de la librería creada. De ellos se seleccionaron 116 que mostraban mayor termoestabilidad que la enzima control (MLV RT RNasa H<sup>-</sup>, portadora de la mutación D524N).

A partir de un análisis más exhaustivo de su estabilidad se seleccionaron las 5 mutaciones que producían el incremento mayor en la estabilidad a temperaturas elevadas, y se creó un mutante con los cinco cambios en su secuencia (E69K/E302R/W313F/L435G/N454K). Esta variante de la RT mantenía más del 90% de su actividad tras incubaciones de 10 min a 55°C.



Tabla 3. Descripción de RTs comercializadas para estudios de expresión génica.

Nombre de la enzima comercial	Empresa que comercializa la enzima y nº de catálogo	Características	Temperaturas recomendadas	Nivel de detección del RNA	Máxima extensión en la síntesis cDNA	Ref <sup>a</sup>
<b>Improm II</b>	Promega #A3800	Retrotranscriptasa mejorada del MLV suplementada con un kit de reactivos óptimos	Óptima: 37-42°C Máxima: 58°C	0,01 µg	7,5 Kb	1
<b>AccuScript</b>	Agilent Technologies, Genomics #200820	Mezcla de RT del MLV y DNA polimerasa con actividad 3'→5' exonucleasa ("proofreading")	37-42°C	10 ng	-	2, 3
<b>OmniScript</b>	Qiagen #205113	RT recombinante heterodimérica (No MLV, no AMV)	37-42°C	50 ng	Alta afinidad por el RNA → producción de cDNAs largos	4
<b>SensiScript RT</b>	Qiagen #205213	RT no descrita	37-42°C	< 50 ng	-	4
<b>GoScript</b>	Promega #A5003	RT del MLV recombinante suplementada con tampones y reactivos estabilizadores	Óptima: 37-42°C Máxima: 55°C	20 pg	>9 Kb	5
<b>Scriptools</b>	Bitools #10071	RT del VIH-1 de grupo O	Óptima: 42°C Máxima: 70°C	0,02 ng	-	6
<b>SuperScript II RT</b>	Invitrogen #18064	RT del MLV RNasa H' con 3 mutaciones puntuales que incrementan su termoestabilidad	Óptima: 37-42°C Máxima: 50°C	0,1 pg	9 Kb	7
<b>SuperScript III RT</b>	Invitrogen #18080	RT del MLV RNasa H' con 7 mutaciones puntuales que incrementan su termoestabilidad	Óptima: 37-42°C Máxima: 55°C	0,5 pg	12,3 Kb	3, 5
<b>AffinityScript</b>	Stratagene #600188	RT mutantes del MLV (E69K, E302R, W313F, L435G y N454K)	Óptima: 37-42°C Máxima: 55°C	1 ng	9 Kb	8
<b>Transcriptor</b>	Roche #04379012001	RT recombinante con una DNA polimerasa con actividad 3'→5' exonucleasa ("proofreading")	Óptima: 37-42°C Máxima: 65°C	50 pg	14 Kb	9, 10
<b>ThermoScript kit</b>	Gibco-BRL #11146-024	RT del AMV RNasa H'	Óptima: 42-48°C Máxima: 65°C	10 pg	12 Kb	3
<b>RevertAid H Minus RT</b>	Fermentas #EP0451	RT del MLV RNasa H'	Óptima: 37-42°C Máxima: 55°C	-	13 Kb	11
<b>RevertAid Premium</b>	Fermentas #EP0731	RT del MLV RNasa H' Mutaciones puntuales que aumentan la termoestabilidad	Óptima: 42-50°C Máxima: 60°C	-	20 Kb	11
<b>Maxima RT</b>	ThermoScientific #K1641	Enzima recombinante de la RT del MLV	Óptima: 37-42°C Máxima: 60°C	5 ng	20 Kb	12
<b>HIV-1 reverse transcriptase</b>	Ambion #AM2045	VIH-1 RT recombinante de grupo M subtipo B	Óptima: 37-42°C Máxima: 50°C	20 ng	-	13

<sup>a</sup> (1) Hoffmann *et al.*, 1996; (2) Arezi y Hogrefe, 2007; (3) Okello *et al.*, 2010; (4) Levesque-Sergerie *et al.*, 2007; (5) Ammerschläger *et al.*, 2009; (6) Alvarez *et al.*, 2009; (7) Gerard *et al.*, 2002; (8) Arezi y Hogrefe, 2009; (9) Kalmar *et al.*, 2013; (10) Euler *et al.*, 2012; (11) Knapp *et al.*, 2011; (12) Baranauskas *et al.*, 2012; (13) Krebs *et al.*, 2008.

En otro trabajo similar se hizo un barrido de 84 mutantes puntuales obtenidos mediante CDR (“compartmentalized ribosome display”, técnica usada para desarrollo de proteínas *in vitro*, seleccionando las enzimas mediante la formación de un complejo mRNA-ribosoma-proteína que queda unido a un ligando determinado). Se estudiaron las propiedades cinéticas de los mutantes seleccionados, y se eligieron los cinco cambios que producían el mayor efecto positivo sobre la afinidad, termoestabilidad o procesividad de la enzima, generándose un mutante múltiple con los cinco cambios seleccionados (D200N/L603W/T330P/ L139P/E607K) que es capaz de realizar la reacción a 62°C, llegando a sintetizar cDNAs de hasta 7,2 Kb (Baranauskas *et al.*, 2012).

Otros trabajos se basan en el diseño racional de variantes con el objetivo de conseguir un incremento de la afinidad por el complejo molde-iniciador. En ellos, se introdujeron mutaciones que aportan carga positiva en las posiciones teóricamente implicadas en la interacción con el molde-iniciador (E286R/G302K/L435R/D524N), consiguiendo mejorar su estabilidad obteniendo enzimas que mantienen el 50% de su actividad a 54-56°C, y que muestran actividad hasta los 60°C (Konishi *et al.*, 2012).

## 1.7. Fidelidad de copia de la RT

Los retrovirus, y en particular el VIH-1, se caracterizan por presentar una alta heterogeneidad genética debida al elevado tamaño de la progenie viral generada durante la infección (Coffin, 1995; Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1998) y a su alta tasa de mutación y recombinación (Domingo y Holland, 1994; Domingo *et al.*, 1996; Drosopoulos *et al.*, 1998; Mansky, 1998).

Durante el ciclo vital del VIH-1, el DNA proviral integrado en el genoma se transcribe a RNA por la RNA polimerasa II celular. Se ha estudiado la fidelidad de las DNA y RNA polimerasas que intervienen en el ciclo del HIV, con el objetivo de explicar la gran variabilidad del virus. Se ha calculado que las tasas de error de las DNA polimerasas celulares son entre 10 y 100 veces menores que las que se obtienen para la RT (Kunkel y Alexander, 1986; Matsuda *et al.*, 2000), por lo que se asume que la heterogeneidad retroviral se debe a los errores introducidos por esta enzima. Si bien la RNA polimerasa II también contribuye a la variabilidad del VIH, algunos datos sugieren que lo hace en menor medida que la RT (O'Neil *et al.*, 2002).

La heterogeneidad genética del VIH permite que aparezcan virus resistentes a fármacos antirretrovirales (revisado en Richman, 1993; Larder *et al.*, 1994) y mutantes de escape a la respuesta del sistema inmune del hospedador (Goudsmit *et al.*, 1991; Phillips *et al.*, 1991). Los estudios realizados para determinar la fidelidad de copia de la RT

indican que la frecuencia de mutación determinada en ensayos *in vitro* (genéticos y bioquímicos) se sitúa alrededor de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  sustituciones por nucleótido. Esto es tan sólo una estimación aproximada, ya que depende de muchos factores como las condiciones del ensayo (pH, concentración de nucleótidos trifosfato...), así como del tipo de molde (RNA o DNA, y su carácter homopolimérico o heteropolimérico) y del contexto de secuencia (revisado en Menéndez-Arias, 2002; Svaroskaia *et al.*, 2003).

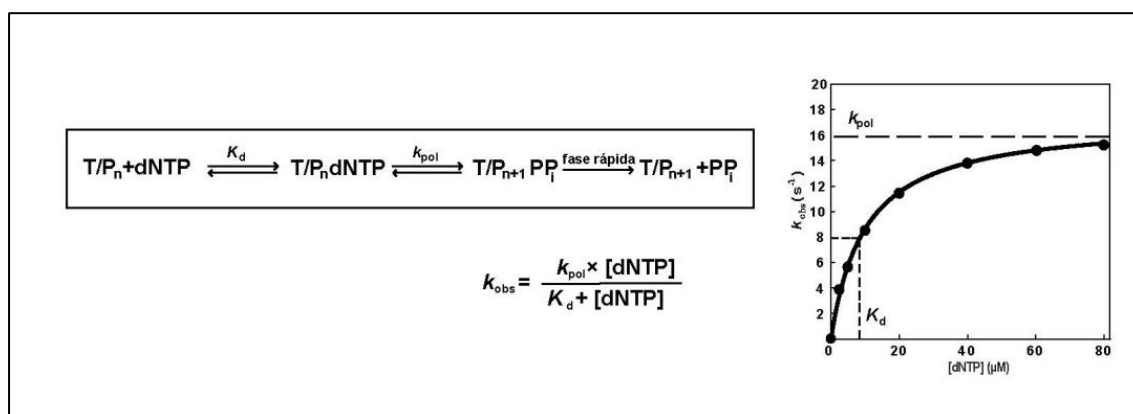
### 1.7.1. Métodos experimentales para la estimación de la fidelidad de copia

La fidelidad de copia de las RTs purificadas puede ser analizada *in vitro* mediante ensayos bioquímicos o ensayos de tipo genético.

Los **ensayos bioquímicos** están basados en la determinación de parámetros cinéticos para la incorporación de nucleótidos correctos o incorrectos en un determinado complejo molde-iniciador, obteniéndose una estimación de la selectividad por nucleótido que caracteriza a la polimerasa estudiada. Se puede determinar la fidelidad de copia sobre moldes DNA o RNA dependiendo del complejo molde-iniciador que se use en el ensayo. Para ello se determinan parámetros cinéticos para la incorporación de nucleótidos tales como  $k_{pol}$  (constante de polimerización) y  $K_d$  (constante de afinidad) (Echols y Goodman, 1991; Johnson, 1993; Zinnen *et al.*, 1994). Su determinación bajo condiciones de estado pre-estacionario permite eliminar la tasa de disociación del complejo molde-iniciador, ya que bajo estas condiciones solo se puede medir la capacidad de la enzima para unirse e incorporar el dNTP a tiempos muy cortos, describiendo por tanto lo ocurrido en un único evento de incorporación (**Figura 9**). Para la realización de estos ensayos se utiliza un iniciador previamente marcado en su extremo 5' con [ $\gamma^{32}P$ ]ATP, con el que se medirá la incorporación de nucleótidos en su extremo 3', en presencia de distintas concentraciones de dNTP y a distintos tiempos, una vez formado el complejo RT/molde-iniciador. En principio, y por lo general, la  $k_{pol}$  es mayor para los nucleótidos correctos que para los incorrectos, y del mismo modo se podría deducir que la afinidad también será mayor para el nucleótido correcto, y por tanto su  $K_d$  será menor. La eficiencia de incorporación errónea ( $f_{inc}$ ) se define como la relación entre la eficacia catalítica ( $k_{pol}/K_d$ ) obtenida para el nucleótido incorrecto y la eficacia catalítica para el nucleótido correcto (Kati *et al.*, 1992). Por tanto, una alta fidelidad de la RT quedará definida por una baja eficiencia de incorporación errónea.

Una vez incorporado el nucleótido incorrecto en la secuencia, la enzima debe ser capaz de extender el extremo desapareado resultante. Esta medida de fidelidad se lleva a cabo mediante ensayos similares a los descritos anteriormente, pero usando complejos desapareados en el extremo 3' del iniciador. Las constantes de afinidad y polimerización

se calculan usando dos tipos de complejos molde-iniciador: complejos con el extremo 3' correctamente apareado y complejos con extremos 3' desapareados. La eficiencia de extensión de extremos desapareados ( $f_{\text{ext}}$ ) se obtiene de la relación de la eficiencia catalítica de extensión ( $k_{\text{pol}}/K_d$ ) obtenida para el complejo desapareado, y la obtenida para el correctamente apareado. Cuando menor es la eficiencia de extensión de extremos desapareados mayor será la fidelidad de la enzima.

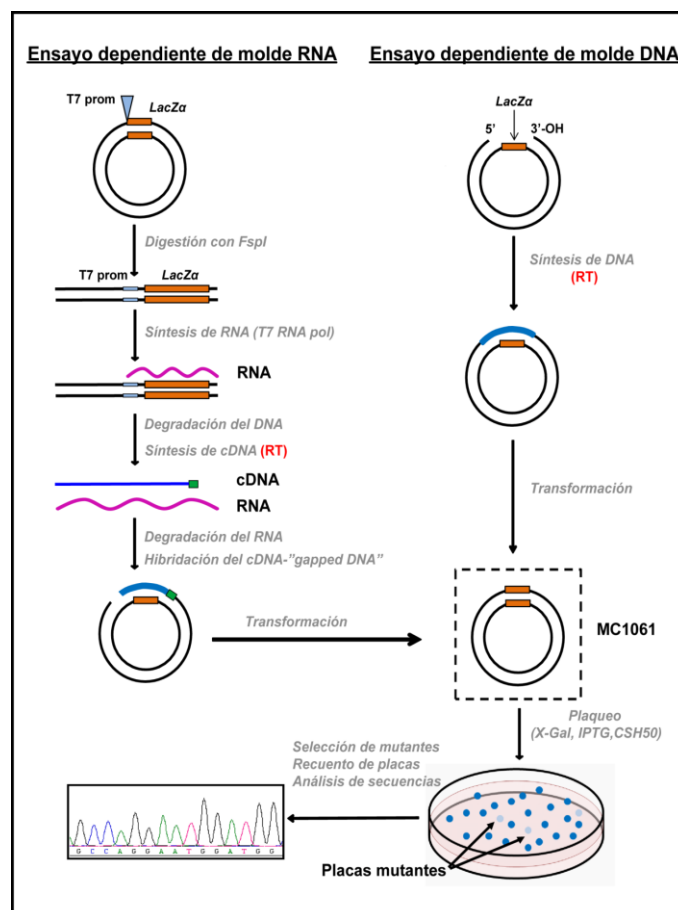


**Figura 9. Reacción de incorporación de un nucleótido y ejemplo de determinación de los parámetros cinéticos  $k_{\text{pol}}$  y  $K_d$  bajo condiciones de estado pre-estacionario.**  $T/P_n$  representa un complejo molde-iniciador con “n” nucleótidos de longitud, y  $T/P_{n+1}$  representa el mismo complejo tras la incorporación de un nucleótido.  $PP_i$  indica la liberación de un pirofosfato tras la incorporación del nucleótido a la cadena.

Los **ensayos genéticos** permiten analizar la fidelidad en un contexto de secuencia más amplio, y obtener estimaciones globales de fidelidad de copia utilizando moldes DNA o RNA. Estos ensayos se basan en el uso de genes reporteros. Entre ellos, el ensayo más popular es el que usa como sustrato DNA de doble cadena del fago M13mp2 con una delección (“gap”) que afecta solamente a una de las cadenas de DNA y que incluye la secuencia que codifica para el gen *lacZ $\alpha$* . Este ensayo se denomina en inglés “forward mutation assay” (**Figura 10**).

La reacción de síntesis para completar el “gap” se realiza en presencia de la RT y de concentraciones elevadas de los cuatro dNTPs. Tras la transformación del producto de reacción en bacterias electrocompetentes, los mutantes se identifican como colonias blancas o azules pálidas en medio de cultivo que contiene X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -galactopiranósido), IPTG (isopropil- $\beta$ -tio-galactopiranósido) y un césped bacteriano F' susceptible a la infección por el virus. De este modo, si en la reacción de síntesis de DNA por parte de la RT no se han cometido errores, el resultado es una placa azul oscuro. Por el contrario, la introducción de uno o varios errores implica la pérdida parcial o total de la  $\alpha$ -complementación, lo que se traduce en placas azul claro o blancas.

El análisis de las secuencias de nucleótidos del gen *lacZ* en el fago M13mp2, extraídas de DNA de fagos aislados de placas sin color o azul claro permite la identificación de los errores producidos, como pueden ser sustituciones de bases, inserciones o deleciones. En la **Tabla 4** se indican las frecuencias de mutantes obtenidas mediante este tipo de ensayo con algunas RTs.



**Figura 10. Descripción esquemática de los ensayos genéticos basados en la expresión de *lacZ*.** Se representan los pasos principales de cada uno de los ensayos genéticos, hasta el paso en el que se lleva a cabo la transformación de *E. coli* MC1061, momento en el que ambos ensayos siguen el mismo proceso. El DNA de doble cadena representado corresponde al del fago M13mp2. La franja naranja representa la secuencia de DNA correspondiente al gen *lacZ*. En la descripción del ensayo dependiente de molde RNA, la zona azul claro indica la secuencia del promotor T7 de la RNA polimerasa del fago T7 que será la enzima encargada de sintetizar el RNA molde (representado como una línea ondulada morada). La parte azul oscuro de la secuencia indica, en el caso del ensayo dependiente de molde RNA, el cDNA sintetizado por la RT, y en el caso del ensayo dependiente de molde DNA, la parte del "gap" que ha sido completado por la RT. El cuadro con líneas discontinuas representa una célula de *E. coli* competente y carente de actividad β-galactosidasa.

Una variación de este tipo de ensayos es el de reversión o "reverse mutation assays". En este caso los moldes tienen una mutación inactivante (codones de terminación o inserciones de un nucleótido). La reversión de la mutación se traduce en la

corrección del error y por tanto en la restauración de la actividad del gen marcador (Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988; Weber y Grosse, 1989)

**Tabla 4. Estimación la frecuencia de mutantes de las RTs determinada con el ensayo genético y usando el *lacZ* como gen reportero en ensayos dependientes de molde DNA.**

Enzima <sup>a</sup>	Frecuencia de mutantes	RT del VIH-1 usada como control <sup>d</sup>	Aumento de fidelidad <sup>e</sup>	Ref. <sup>h</sup>
<b>VIH-1 grupo O</b>	$5,5 \times 10^{-5}$	BH10 (p66/p51)	2,5	1
<b>SIV<sub>agm</sub><sup>b</sup></b>	$2,9 \times 10^{-5}$	HXB2 (p66/p51)	1,8	2
<b>SIV<sub>mne</sub><sup>b</sup></b>	$1,2 \times 10^{-4}$ (CL8) <sup>c</sup>	BH10 (p66/p51) <sup>f</sup>	1,3	3
	$1,6 \times 10^{-5}$ (170) <sup>c</sup>		9,7	
<b>FIV</b>	$6,2 \times 10^{-5}$	BH10 (p66/p51)	2,8	4
<b>MLV</b>	$3,3 \times 10^{-5}$	(p66/p61) <sup>f</sup>	14,3	5
<b>FeLV</b>	$5,8 \times 10^{-6}$	BH10 (p66/p51) <sup>g</sup>	29	4
<b>AMV</b>	$5,9 \times 10^{-5}$	(p66/p61) <sup>f</sup>	9,5	5
<b>PFV</b>	$1,7 \times 10^{-4}$	BH10 (p66/p51)	0,4	6
<b>Retrotransposon R2</b>	$1,2 \times 10^{-4}$	BH10 (p66/p66)	1,2	7

<sup>a</sup> VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1; SIV: Virus de la inmunodeficiencia de simios; FIV: virus de la inmunodeficiencia de felinos; MLV: virus de la leucemia de ratón; FeLV: virus de la leucemia de felinos; AMV: virus de la mieloblastosis de aves; PFV: "prototype foamy virus" (*Spumaretrovirus* que infecta a humanos).

<sup>b</sup> Virus de la inmunodeficiencia de simios; agm: mono verde africano; mne: macaco de cola de cerdo.

<sup>c</sup> CL8 y 170: variantes del SIV<sub>mne</sub> que infectan al mismo simio. La cepa 170 fue aislada de la fase asintomática y la cepa CL8 se aisló de la fase tardía en la que ya se manifestaban los síntomas de la infección.

<sup>d</sup> Las frecuencias de mutantes descritas para la RT del VIH-1 de grupo M subtipo B usadas en la comparación están en un rango de  $0,68 \times 10^{-4}$  a  $4,7 \times 10^{-4}$ .

<sup>e</sup> Incremento de fidelidad respecto a la enzima WT del VIH-1 de grupo M subtipo B utilizada

<sup>f</sup> La frecuencia de mutantes utilizada en esta comparación se tomó de Weiss *et al.* (2004)

<sup>g</sup> Cepa de VIH-1 de grupo M de subtipo B no especificada (Roberts *et al.*, 1988)

<sup>h</sup> (1) Álvarez *et al.*, 2009; (2) Stuke *et al.*, 1997; (3) Diamond *et al.*, 2003; (4) Operario *et al.*, 2005; (5) Roberts *et al.*, 1989; (6) Boyer *et al.*, 2007; (7) Jamburuthugoda y Eickbush, 2011

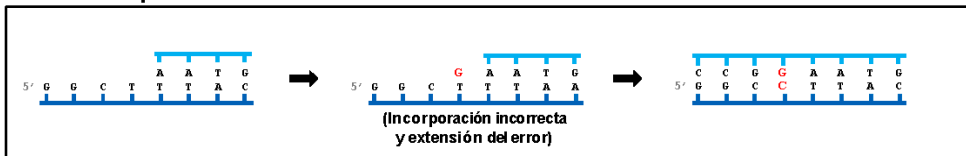
El ensayo anteriormente descrito (“forward mutation assay”) también puede adaptarse para determinar la fidelidad de copia de la RT en reacciones de polimerización de DNA en presencia de RNA como molde. En un primer paso se obtiene el RNA molde a partir del DNA del fago M13mp2 al que se le ha añadido la secuencia correspondiente al promotor de la RNA polimerasa del fago T7. El RNA sintetizado por la RNA polimerasa, que corresponde a la secuencia de la región codificante del gen *lacZ $\alpha$*  es el molde utilizado por la RT para sintetizar el cDNA que finalmente será hibridado con el DNA que contiene el “gap” en una de sus cadenas. De esta forma, al igual que en el ensayo descrito anteriormente, se observará una atenuación o una pérdida total de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, dependiendo del tipo de errores introducidos en la cadena de cDNA (Boyer *et al.*, 1992).

En el esquema de formación de mutaciones de la **Figura 11** se explica cuál podría ser el mecanismo molecular que diese lugar a los distintos cambios que se observan en los ensayos genéticos. Los cambios de base pueden deberse a la incorporación de un nucleótido incorrecto en la secuencia, debido a un alineamiento incorrecto con el molde que vuelve a realinearse correctamente cuando ya se ha extendido la cadena, dando como resultado bases desapareadas. Algo similar ocurre cuando el iniciador se alinea incorrectamente con el molde durante la síntesis de DNA.

Por otro lado, están los cambios en el marco de lectura producidos por pérdida o ganancia de uno o varios nucleótidos en la cadena. Las explicaciones a este tipo de errores son parecidas a las descritas en los cambios de base. Tras la incorporación de una base incorrecta se produce una reordenación de la cadena para producir un alineamiento correcto que consecuentemente se traduce en la pérdida o delección de un nucleótido. Alternativamente, debido a un mal alineamiento del molde o del iniciador se puede producir la inserción o ganancia de un nucleótido en la cadena o en el caso contrario la delección de una base. Existen secuencias donde aumenta la probabilidad de que se introduzcan errores en la cadena, tanto cambios de base como delecciones o inserciones. Esto suele ser en regiones homopoliméricas de la secuencia (“*runs of nucleotides*”) (Bebenek *et al.*, 1993).

### Cambios de base

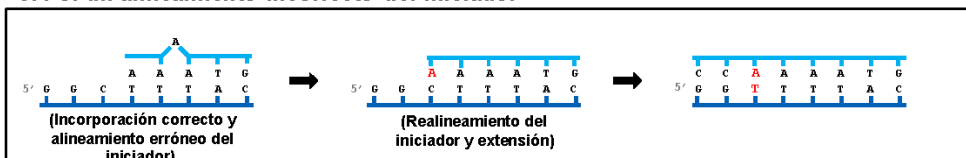
#### 1. Por incorporación errónea



#### 2. Por un alineamiento incorrecto del molde

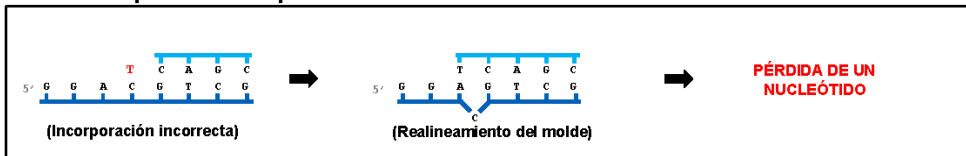


#### 3. Por un alineamiento incorrecto del iniciador



### Cambios en el marco de lectura

#### 1. Iniciada por una incorporación incorrecta



#### 1. Por alineamiento incorrecto del molde o del iniciador

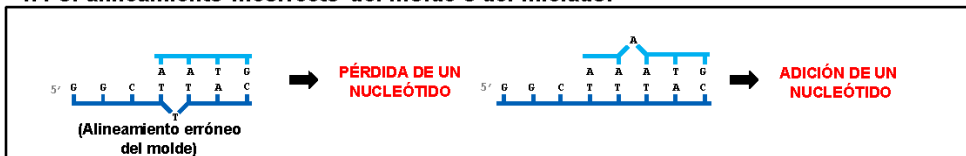
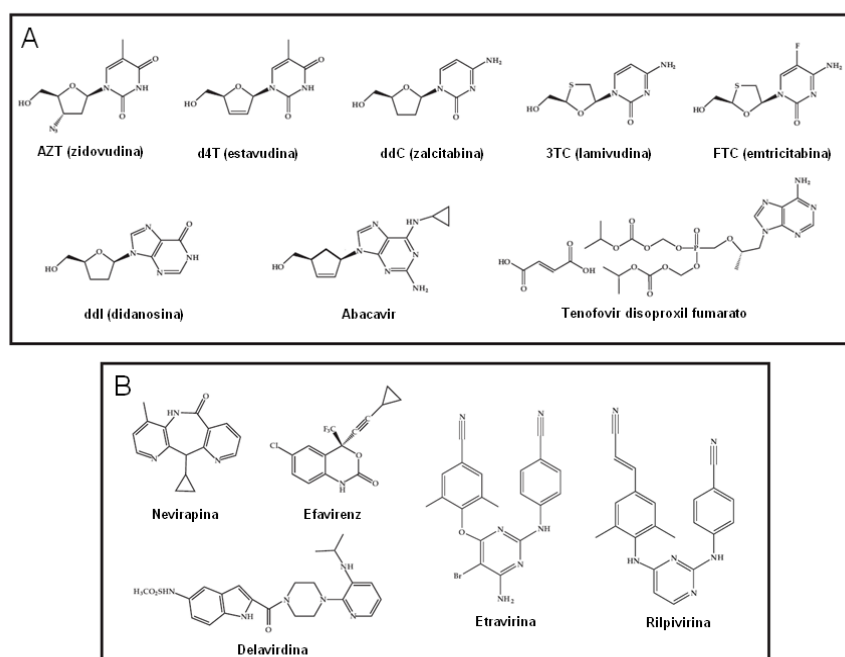


Figura 11: Esquema de modelos propuestos para explicar la producción de los distintos tipos de mutaciones. Figura adaptada de Bebenek *et al.* (1993).

### 1.7.2. Bases moleculares de la fidelidad de copia en la RT del VIH-1

La RT juega importante papel como diana en la terapia antirretroviral y en el estudio de fármacos, debido a su función en el ciclo vital del virus. Cerca del 50% de los fármacos para el tratamiento del VIH-1 son inhibidores de la RT. Estos fármacos pueden clasificarse como inhibidores análogos a nucleósido (NRTIs) o no análogos a nucleósido (NNRTIs) (Figura 12).





**Figura 12. Estructuras químicas de los inhibidores de la RT aprobados para su uso clínico. (A)** Inhibidores análogos a nucleósido. **(B)** Inhibidores no análogos a nucleósido.

Las terapias que combinan inhibidores de la RT análogos y no análogos a nucleósido o que actúan sobre 2 o más dianas moleculares, han mejorado notablemente la duración y calidad de vida de los pacientes infectados por el VIH. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos se ve limitada por factores como la tolerancia o la toxicidad a largo plazo, además de que la alta tasa de mutación del virus y su elevada frecuencia de recombinación hacen que aparezcan variantes virales resistentes a los fármacos, lo que conlleva un fracaso del tratamiento (Menéndez-Arias, 2013).

Debido a su gran importancia como diana terapéutica para el tratamiento de las infecciones por VIH, la RT ha sido objeto de estudio exhaustivo durante los últimos años. Se ha estudiado el papel que desempeñan los distintos aminoácidos de la enzima en la adquisición de resistencia a tratamientos antirretrovirales, además del efecto de mutaciones sobre sus actividades DNA polimerasa y RNasa H. Mediante análisis por mutagénesis dirigida de las distintas posiciones de la enzima, se ha demostrado que los determinantes estructurales más importantes en la fidelidad de copia de la RT del VIH-1 están localizados en el dominio DNA polimerasa.

Algunos de los residuos que rodean la triada catalítica del dominio DNA polimerasa (Asp110, Asp185 y Asp186), como es el caso de Lys65, Arg72, Tyr115, Gln151 o Met184, forman parte del sitio de unión del dNTP. Varios de los cambios

estudiados que afectan a los residuos del sitio de unión del dNTP producen un aumento en la fidelidad de copia de la RT (por ejemplo K65R, Q151N, M184I, M184V y M184L) (Huang *et al.*, 1998; Rezende *et al.*, 1998; Jonckheere *et al.*, 2000) (**Tabla 5**). La reducción en la tasa de mutación en las enzimas portadoras de estos cambios se debe a una disminución en la eficiencia de incorporación de nucleótidos incorrectos o a una menor eficacia a la hora de extender extremos desapareados. Por otro lado, también se han descrito cambios en residuos que afectan negativamente a la fidelidad de copia mostrada por la enzima, como por ejemplo el cambio de Tyr115 por Ala, que aumenta la tasa de error en aproximadamente 4 veces. Esto se debe a una reducción en la capacidad de discriminación del nucleótido entrante (Martín-Hernández *et al.*, 1997; Boyer *et al.*, 2000; Cases-González *et al.*, 2000).

Otros residuos implicados en fidelidad son los que interaccionan con el extremo 5' desapareado del molde. La mayoría de ellos se encuentran localizados en el subdominio "fingers". En general, los cambios introducidos muestran un incremento en la fidelidad de copia de la enzima, especialmente cuando se trata de mutaciones que afectan a los aminoácidos localizados en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  como son L74V, V75I, D76I, D76R, D76V y R78A, llegando a mostrar una reducción en la tasa de mutación de hasta 8 veces en comparación con la enzima "wild-type", en ensayos basados en la expresión del *lacZ* (Kim *et al.*, 1998; Mansky *et al.*, 2003; Matamoros *et al.*, 2008).

Sin embargo, alguno de los efectos más significativos sobre la fidelidad de copia de la RT se producen por cambios que alteran la región que contacta con el iniciador en la subunidad p66 de la enzima. Las enzimas que presentan Ala en lugar Phe227, Trp229, Met230, Gly231 o Tyr232 son menos eficientes en la extensión de extremos desapareados, y por tanto se caracterizan por una menor tasa de mutación que la enzima "wild type" (Wisniewski *et al.*, 1999). Sin embargo, en el caso de los residuos que interaccionan con el iniciador también se encuentran cambios que disminuyen la fidelidad de la enzima, tales como Y183F (Tyr183 interacciona con el nucleótido 3' terminal del iniciador), que además de la disminución de la fidelidad de copia también produce un descenso en su procesividad. Este mismo efecto también se observa con el cambio M230I (la cadena lateral de Met230 interacciona con la posición -2 del iniciador) (Gutiérrez-Rivas y Menéndez-Arias, 2001; Cases-González y Menéndez-Arias, 2004)

**Tabla 5. Efecto de las sustituciones de aminoácidos sobre la fidelidad de copia de la RT del VIH-1, estimado mediante ensayos bioquímicos y genéticos.**

Región de la RT	Residuo	Mutación	Cambio en la fidelidad <sup>a</sup>		Referencias
			Ensayo bioquímico	Ensayo genético	
Residuos del sitio de unión del dNTP	Lys65	K65R	▲	▲	1, 15
		K65A	▲	▲	1
	Lys 66	K66R	≈	ND	2
		K66A	▲	ND	2
		K66N	▲	ND	2
		K66T	▲	ND	2
	Arg72	R72A	▼/▲	▲	3
	Ala114	A114S	≈	≈	4
		A114G	≈	≈	4
	Tyr115	Y115A	▼	▼	5, 6, 15
		Y115F/V	▼	≈	7, 8, 9
		Y115L/I/N	▼	ND	10
		Y115M/H/G	▼	ND	10
		Y115C/S/W	▼	ND	6, 8, 10
	Gln151	Q151M	≈	≈	11, 13
		Q151N	▲	▲	12, 13, 14
	Phe160	F160Y	≈	ND	16
		F160W	≈	ND	16
	Met184	M184I	▲	▲	17
		M184A	▼	ND	5
		M184V	▲/▼	≈	5
		M184L	▲	ND	5
	Val148	V148I	▲	▲	18
	Tyr183	Y183F	ND	▼	5
Residuos que interaccionan con la cadena molde	Trp24	W24G	▲	ND	19
	Phe61	F61A	ND	▲	20
		F61G	▼	ND	19
	Lys74	L74V	▲	▲	15, 21
	Val75	V75A	▼	▼	9
		V75F	▲	▲	9
		V75I	▲	▲	9
	Asp76	D76V	▲	▲	15, 22, 23
	Arg78	R78A	ND	▲	15, 22
	Glu89	E89G	ND	▲	5, 15, 24
		E89K	ND	▲	25
		E89S	ND	▲	25
		E89V	ND	▲	25
Residuos que interaccionan con la cadena del iniciador (horquilla β12- β13)	Phe227	F227A	▲	ND	26
	Trp229	W229A	▲	ND	26
	Met230	M230L	ND	▼	27
		M230I	▼	▼	8, 27
	Gly231	G231A	▼	ND	28
Residuos que forman el "minor groove binding track" (Hélice H, subdominio "thumb")	Tyr232	Y232A	▼	ND	28
	Gln258	Q258A	ND	▼	29
	Gly262	G262A	ND	▼	30
	Trp266	W266A	ND	▼	29, 30
	Gln269	Q269A	ND	▼	29
Residuos de la αHélice H del subdominio <i>thumb</i>	Asp256	D256A	ND	▼	31
	Lys259	K259A	ND	▼	31, 32
	Leu260	L260A	ND	▼	31
	Lys263	K263A	ND	▼	31
Residuos de la αHélice I del subdominio <i>thumb</i>	Arg277	R227A	≈	▲	32
	Gln278	Q278A	≈	▼	32
	Leu279	L279A	≈	▲	32
	Cys280	C280A	≈	▼	32
	Lys281	K281A	≈	▲	32
	Leu282	L282A	≈	▲	32
	Arg284	R284A	≈	▼	32
	Gly285	G285A	≈	≈	32
	Lys287	K287A	≈	▲	32

<sup>a</sup> El símbolo ▼ indica una disminución de fidelidad, ▲ indica un aumento de la fidelidad y ≈ indica que el cambio estudiado no produce ni aumento ni disminución de la fidelidad en comparación con la enzima WT. Si alguna de las mutaciones no ha sido analizada se indica como **ND**.

<sup>b</sup> Las referencias corresponden a los siguientes artículos: (1) Garforth *et al.*, 2010; (2) Lwatula *et al.*, 2012; (3) Lewis *et al.*, 1999; (4) Cases-González y Menéndez-Árias, 2005; (5) Jonckheere *et al.*, 2000; (6) Martín-Hernández *et al.*, 1996 (7) Boyer & Hughes, 2000; (8) Gutiérrez-Rivas y Menéndez-Árias, 2001; (9) Matamoros *et al.*, 2008; (10) Martín-Hernández *et al.*, 1997; (11) Rezende *et al.*, 1998a; (12) Weiss *et al.*, 2000; (13) Weiss *et al.*, 2002; (14) Jamburuthugoda *et al.*, 2005; (15) Mansky *et al.*, 2003; (16) Gutiérrez-Rivas *et al.*, 1999; (17) Rezende *et al.*, 1998b; (18) Weiss *et al.*, 2004; (19) Agopian *et al.*, 2007; (20) Fisher y Prasad, 2002; (21) Shah *et al.*, 2000; (22) Kim *et al.*, 1998; (23) Kim *et al.*, 1999; (24) Hamburg *et al.*, 1998; (25) Hamburg *et al.*, 2006; (26) Wisniewski *et al.*, 1999; (27) Cases-González y Menéndez-Árias, 2004; (28) Wöhrl *et al.*, 1997; (29) Beard *et al.*, 1998; (30) Bebenek *et al.*, 1995; (31) Beard *et al.*, 1994; (32) Beard *et al.*, 1996.

Por otro lado, se han realizado estudios con mutantes que afectan a residuos más alejados del centro activo, como los que forman parte de la  $\alpha$ -hélice H del subdominio “thumb”. Los cambios G262A o W266A producen una disminución de la fidelidad de copia al aumentar la frecuencia de inserciones o deleciones durante la síntesis de DNA debido a su reducida procesividad (Bebenek *et al.*, 1995; Mansky *et al.*, 2003).

Finalmente se han descrito cambios de aminoácido en el dominio RNasa H tales como Y501W que producen una disminución de fidelidad. Además el cambio E478Q, que inhibe la actividad RNasa H produce un incremento de fidelidad de casi 2 veces en comparación con la enzima WT (Álvarez *et al.*, 2013). No obstante, cambios en otras posiciones de este dominio no producen ningún efecto en la fidelidad de la enzima, como en el caso de la sustitución de una Ile por una Ala en la posición 505 (Mansky *et al.*, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

1. Determinar la fidelidad de copia de las RTs del XMRV y del MLV mediante ensayos de incorporación de nucleótidos correctos e incorrectos y ensayos genéticos basados en la expresión del gen *lacZ* y compararla con la de RTs del VIH-1 de aislados filogenéticamente alejados entre sí (de grupo M subtipo B y de grupo O).

2. Expresar y purificar variantes de la RT del VIH-1 grupo O portadoras de mutaciones que mejoren su fidelidad de copia y especificidad de nucleótido, manteniendo su eficacia catalítica a temperaturas elevadas. Analizar la fidelidad de copia y estabilidad a temperaturas superiores a 37°C de las variantes obtenidas, en comparación con las de la enzima no mutada.

3. Determinar las tasas de error y espectros de mutaciones generadas por las RTs mutantes en reacciones de síntesis de DNA dependiente de DNA y compararlas con las de RTs de variantes del VIH-1 y de oncorretrovirus.

4. Extender el análisis anterior al estudio de fidelidad de síntesis de DNA utilizando molde RNA.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Descripción de las RTs utilizadas

En este trabajo se han utilizado RTs “wild type” (WT) procedentes de distintos retrovirus. Así, del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) se han utilizado RTs derivadas de la cepa BH10 (GenBank ID: M15654), clasificada como de grupo M subtipo B (Wong-Staal *et al.*, 1985) y de la cepa ESP49 (Menéndez-Arias *et al.*, 2001), clasificada como de grupo O (GenBank ID: U97171.1). Además, se han usado RTs de oncorretrovirus, tales como la RT del virus Moloney de la leucemia de ratón (MLV RT) (GenBank ID: NC001501) y la RT del virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia de ratón (XMRV RT) (GenBank ID: DQ399707) (**Figura 13**).

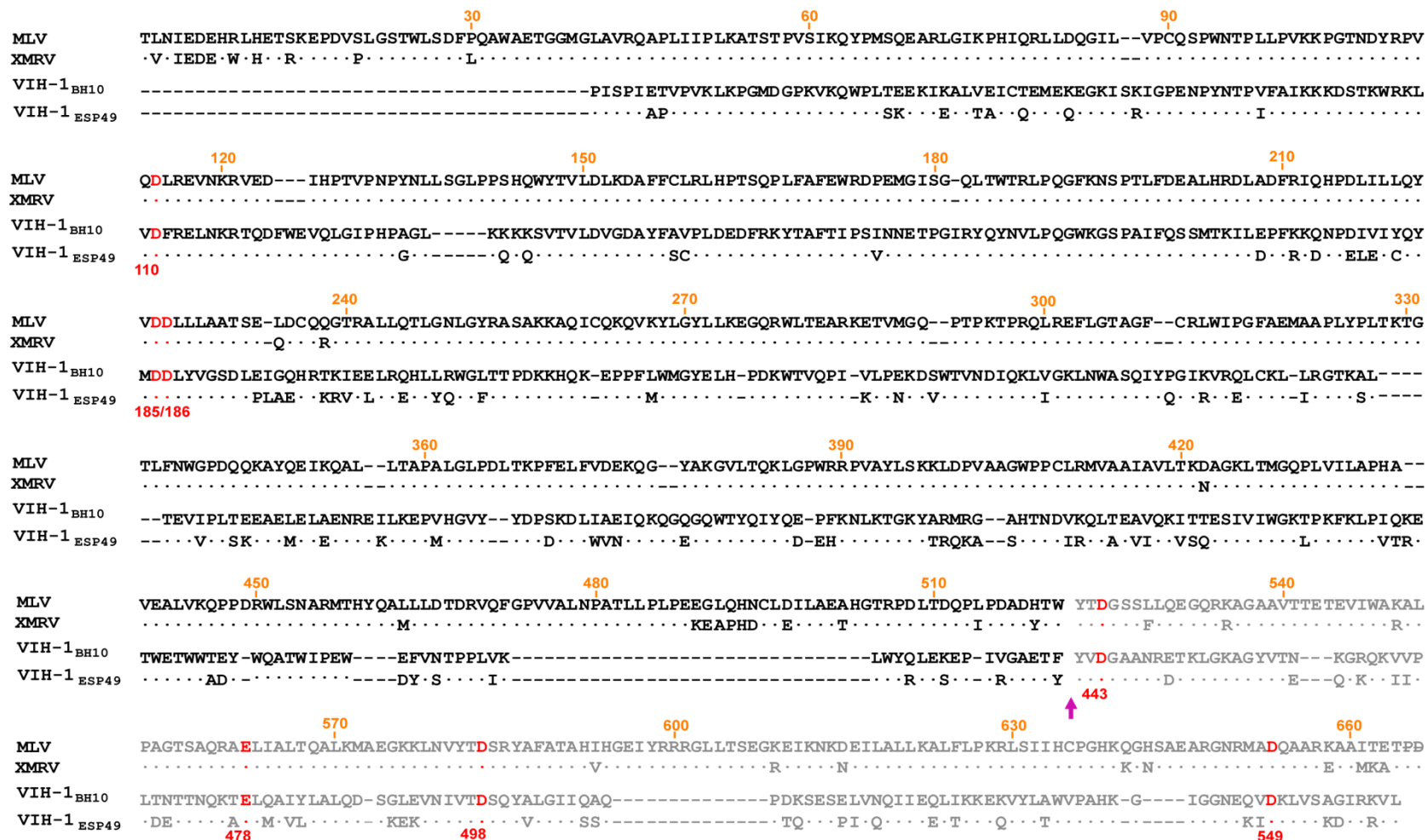
Las RTs del VIH-1 fueron expresadas y purificadas en el laboratorio al igual que la RT de MLV portadora de una cola de poli-His en el extremo N-terminal. Además, en algunos ensayos se utilizó una RT del MLV comercial suministrada por Promega (número de catálogo: M1701). La RT del virus XMRV fue suministrada por el Dr. Stuart F. Le Grice (National Cancer Institute, Frederick, EE.UU.) y obtenida de acuerdo al protocolo descrito por Gillette *et al.* (2011).

#### 3.2. Clonación de la región codificante de las RTs

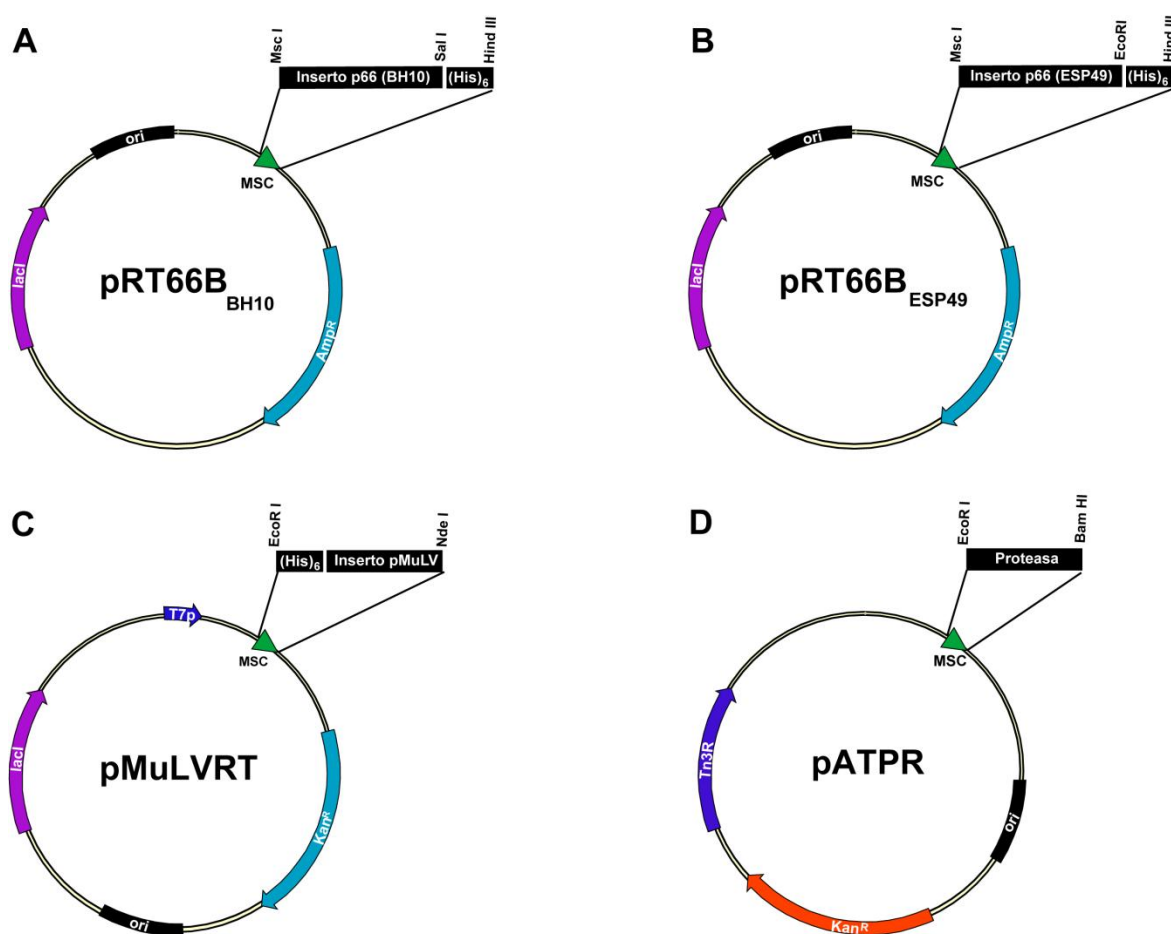
Las secuencias codificantes para la subunidad p66 de las RTs del VIH-1 se habían clonado previamente en el vector pRT66B utilizando los sitios MscI y HindIII (Boretto *et al.*, 2001). Los vectores de expresión resultantes pRT66B<sub>BH10</sub> y pRT66B<sub>ESP49</sub> que llevan las secuencias de nucleótidos de la subunidad p66 del VIH-1 de grupo M subtipo B y del VIH-1 de grupo O (Menéndez-Arias *et al.*, 2001), respectivamente, se utilizaron para la expresión y purificación de las enzimas de VIH-1 (**Figura 14A,B**).

Para la expresión de la RT del MLV se utilizó el vector pMuLVRT, cedido por el Dr. Baek Kim (Emory University, Atlanta, EE.UU.). El pMuLVRT, derivado del plásmido pET28a (Novagen, Madison, WI, EE.UU.), lleva la secuencia completa de la RT, introducida entre los sitios de restricción NdeI y EcoRI (Malboeuf *et al.*, 2001). En el extremo 5' de la secuencia de la RT (región N-terminal) lleva una cola de 6 histidinas (**Figura 14C**).





**Figura 13. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las RTs de MLV, XMRV, VIH-1<sub>BH10</sub> y VIH-1<sub>ESP49</sub>.** La numeración en la parte superior corresponde a las RTs de *Gammaretrovirus* (MLV y XMRV), y la numeración inferior hace referencia a las posiciones de VIH-1. Se han marcado en rojo los residuos catalíticos de VIH-1 en el dominio polimerasa (Asp110, Asp185 y Asp186) y los residuos catalíticos del dominio RNasa H (Asp443, Glu478, Asp498 y Asp549). La flecha marca el punto de corte de la PR en la secuencia del VIH-1. Los puntos (·) indican coincidencia de aminoácido con la secuencia superior, y el guión (-) significa ausencia de ese residuo en la secuencia correspondiente. Figura adaptada de Coté y Roth (2008).



**Figura 14. Plásmidos utilizados para la mutagénesis y la expresión de las RTs.** (A) Plásmido **pRT66B<sub>BH10</sub>**. Construcción derivada del plásmido pTrc99A (Amersham Biosciences) al que se le introdujo la región codificante de la p66 de la RT del VIH-1 de grupo M subtipo B (BH10) y una región que codifica para 6 histidinas en su extremo 5', usando las dianas de restricción MscI y HindIII del sitio multiclonaje (Boretto *et al.*, 2001). (B) Plásmido **pRT66B<sub>ESP49</sub>**. Misma construcción que el plásmido representado en A, pero la secuencia introducida codifica para la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de grupo O. (C) Plásmido de expresión de la RT de MLV. El plásmido **pMuLVRT** es un derivado de un pET28 en el que se ha clonado la secuencia que codifica para la RT de MLV entre los sitios de corte EcoRI y NdeI (Malboeuf *et al.*, 2001). (D) Plásmido de expresión de la proteasa. El plásmido **pATPR** se construyó a partir de un pAT clonado en el gen de la proteasa de VIH-1 precedida por un codón ATG y el sitio de unión de ribosomas (RBS) de T7g10, entre los sitios de restricción EcoRI y BamHI (Boretto *et al.*, 2001). Este plásmido se coexpresa con el pRT66B representado en A para que se produzca el procesamiento de la p66 de la RT. Amp<sup>R</sup>: indica la región codificante del gen de resistencia a ampicilina. Kan<sup>R</sup>: indica la región codificante del gen de resistencia a kanamicina. (His)<sub>6</sub>: indica la secuencia codificante para la cola de 6 histidinas. T7p: indica la posición del promotor de la expresión del fago T7.

### 3.3. Mutagénesis dirigida

Las variantes de la RT caracterizadas en este trabajo se obtuvieron introduciendo mutaciones en la región codificante de la RT del aislado ESP49 de grupo O del VIH-1 previamente clonada en el vector pRT66B<sub>ESP49</sub> (**Figura 14B**). La introducción de mutaciones en la región codificante de la RT viral se llevó a cabo con el sistema de mutagénesis dirigida *in vitro*, “QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene. Se utilizaron una serie de oligonucleótidos mutagénicos (**Tabla 6**) con los que se introdujeron las mutaciones en el plásmido pRT66B que contenía la región codificante de la subunidad p66 de la RT de la cepa específica.

**Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis.**

Mutaciones introducidas <sup>a</sup>		Oligonucleótidos <sup>b</sup>	
<b>K65R</b>	5'	CTTTGCTATAAAA <b>AGG</b> AAAGATAGTACTAAGTGG	3'
	3'	GAAACGATATTTT <b>TCC</b> TTTCTATCATGATTCACC	5'
<b>V75I</b>	5'	CAGTACTAAATGGAGAAAATTA <b>A</b> TAGATTTTCAGAGA	3'
	3'	GTCATGATTTACCTCTTTTAATT <b>TAT</b> CTAAAGTCTCT	5'
<b>R78A</b>	5'	GCTGGTAGACTTT <b>GCG</b> GAATTAAACAAGAG	3'
	3'	CGACCATCTGAA <b>ACG</b> CCTTAATTTGTTCTC	5'
<b>V75I/R78A</b>	5'	GCT <b>GAT</b> AGACTTT <b>GCG</b> GAATTAAACAAGAGAAC	3'
	3'	CGACT <b>TAT</b> CTGAA <b>ACG</b> CCTTAATTTGTTCTCTTG	5'

<sup>a</sup> Mutaciones obtenidas, utilizando el código de una letra, de modo que se muestra el nombre del aminoácido en la secuencia de la RT, seguido de la posición y sustitución realizada. Los nucleótidos correspondientes a la mutación introducida en la región de la RT. Todas las mutaciones fueron confirmadas mediante secuenciación.

<sup>b</sup> Para la introducción de dichas mutaciones se utilizaron dos oligonucleótidos, una para la hebra sentido (5'→3') y otro para la antisentido (3'→5').

La reacción de mutagénesis se llevó a cabo en 50 µl de un tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,8), que contenía KCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 al 0,1%, seroalbúmina bovina (BSA) libre de nucleasa a 0,1 mg/ml, 125 ng de cada uno de los oligonucleótidos diseñados para la introducción de la mutación correspondiente, 5-50 ng de plásmido (pRT66B), los cuatro dNTPs a una concentración de 500 µM cada uno y 2,5 U de la DNA polimerasa Pfu Turbo (Stratagene). La amplificación se inició con una incubación de 2 min a 95°C seguida de 20 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 55°C y 12 min a

68°C. Finalmente, se dejó enfriar la reacción hasta 4°C. Se analizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%. El producto de la reacción se trató con la enzima de restricción DpnI (Promega) usando 10 U de enzima por muestra a 37°C durante 1 hora. DpnI es una endonucleasa que actúa sobre el DNA metilado o hemimetilado (plásmidos procedentes de una cepa *dam*<sup>+</sup> de *E. coli*) y que por tanto degrada el DNA que se ha usado como molde en la reacción de amplificación. De esta forma se obtienen los plásmidos cuyo vector contiene los cambios deseados. De nuevo, se analizaron las muestras tras la digestión en un gel de agarosa al 1%, para detectar en las muestras amplificadas la presencia de una banda de DNA.

Posteriormente, mediante choque térmico, se transformaron células competentes *E. coli* DH5α [F',  $\phi$ 80*dlacZ*ΔM15, Δ (*lacZYA-argF*), U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>*+), *phoA*, *supE44*, λ<sup>-</sup>, *thi-1*, *gyr96*, *relA1*] con 5 μg del producto de la reacción de mutagénesis. Se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina. El DNA extraído de estas colonias seleccionadas mediante el kit "Wizard Plus SV Minipreps" (Promega) se secuenció para identificar las mutaciones. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo a través del servicio de MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur). El análisis de las secuencias se realizó con el paquete Seqman 4.0 (DNASTar Inc.).

Los DNAs portadores de la mutación correcta se utilizaron para transformar mediante choque térmico células competentes *E. coli* XL1-Blue [*recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*<sup>-</sup>, (F', *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*, ΔM15)] portadoras del plásmido pATPR que lleva la secuencia que codifica para la PR del VIH-1 (subtipo B del grupo M), además del gen de resistencia a kanamicina (**Figura 14D**). Tras la última transformación, se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina y kanamicina, ya que solo nos interesan las que contengan ambos plásmidos, ya que la PR es necesaria para el procesamiento de la subunidad p66 de la RT, para dar lugar a la subunidad p51 y formar el heterodímero p66/p51 (Boretto et al., 2001).

### 3.4. Purificación de RTs

#### 3.4.1. Expresión y purificación de RTs del VIH-1

##### 3.4.1.1. Expresión del heterodímero p66/p51 de la RT

Se inocularon 20 ml de medio LB (medio Luria Bertani que contiene 10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por litro) con ampicilina (100 μg/ml) y kanamicina (50 μg/ml), con 10 μl de un pre-cultivo de bacterias *E. coli* XL1-Blue

PR portadoras de los plásmidos pRT66B<sub>BH10</sub> o pRT66B<sub>ESP49</sub> y pATPR. Este cultivo se dejó toda la noche a 37°C en agitación constante (200-250 rpm). Por la mañana se añadieron 300 ml de medio LB con antibióticos y se mantuvo a 37°C y en agitación constante durante 4 h más. Pasado este tiempo, se repartió el cultivo anterior en 3 matraces, con 1 litro cada uno de medio LB con ampicilina y kanamicina a 100 µg/ml y 50 µg/ml, respectivamente. Cuando la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor entre 0,6 y 0,8, se añadió IPTG a una concentración final de 0,6 mM para inducir la expresión de la enzima. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 h. Por último, se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 30 min a 4°C utilizando un rotor JLA-10500 (Beckman Coulter<sup>TM</sup>).

#### **3.4.1.2. Lisis celular**

A partir de 3 litros de cultivo se recogieron aproximadamente 10 g de bacterias en cada crecimiento. Para lisar las células se añadieron, por cada gramo de células, 2 ml de tampón Tris-HCl 40 mM (pH 8,0) conteniendo ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 25 mM, sacarosa al 10%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, benzamidina 2 mM y lisozima 1 mg/ml. Tras agitación constante a 4°C durante 15 min, se añadió el mismo volumen de una disolución que contenía NP-40 al 0,8%, ditiotreitolo (DTT) 20 mM, PMSF 1 mM y benzamidina 2 mM. Entonces, se volvió a incubar a 4°C durante 15 min, y a continuación se añadió NaCl a una concentración final de 0,5 M. Finalmente, se sonicó la muestra en un aparato Labsonic M (Sartorius), a una amplitud constante del 24% durante 1 min. La mezcla resultante se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min a 4°C en un rotor JLA-10500 (Beckman Coulter<sup>TM</sup>) para eliminar el sedimento. Tras la centrifugación, el sobrenadante se diluyó 7 veces con tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8) y se mantuvo a 4°C hasta el inicio del proceso de purificación de la RT.

#### **3.4.1.3. Cromatografía de intercambio iónico**

Se preparó una columna de fosfocelulosa P11 (Whatman) según las indicaciones del fabricante y se equilibró con el tampón en el que teníamos diluida la muestra [fosfato sódico 50 mM (pH 6,8)]. Con la columna correctamente equilibrada, se añadió la muestra y se lavó con 10 volúmenes del mismo tampón. La elución de la muestra retenida en la columna se realizó con un gradiente de NaCl, preparado con 40 ml de tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8) y con 40 ml de tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8) que contenía NaCl a una concentración final de 2 M. Con la ayuda de un colector se recogieron fracciones de 2 ml, se midió su absorbancia a 280 nm y se analizó una

pequeña muestra de cada fracción (10 µl) en un gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico (SDS) (10-12% acrilamida), para de esta manera comprobar en qué fracciones encontrábamos enzima y verificar la presencia de las dos subunidades de la RT (p66 y p51) en cantidades equimoleculares. Tras este paso, se continuó con la purificación tras juntar las fracciones que contenían la RT con sus dos subunidades en la proporción correcta.

#### **3.4.1.4. Cromatografía de afinidad**

La mezcla anterior se pasó por una columna de Ni<sup>2+</sup>-ácido nitriloacético-agarosa (ProBond™, Invitrogen) previamente equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), que contenía NaCl 0,3 M. Se pasó el eluido de la columna varias veces para conseguir que quedara retenida la mayor cantidad de enzima posible. Se procedió a los lavados con tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,0), que contenía NaCl 0,5 M, hasta que la absorbancia del eluido fuera prácticamente cero. A continuación, se procedió a la elución de la enzima con un gradiente de imidazol preparado con 20 ml de tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,0), que contenía NaCl 0,5 M y 20 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, (pH 6,0), que contenía NaCl 0,5 M e imidazol 0,5 M. Se recogieron fracciones de 2 ml y se midió su absorbancia a 280 nm. De nuevo, se juntaron las fracciones enriquecidas en proteína y se dializó la mezcla frente a un tampón de diálisis 50 mM Tris-HCl (pH 7,0), NaCl 25 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10%, y DTT 1 mM, utilizando bolsas de diálisis de tipo Visking 20/32 de 16 mm (Serva).

Tras cuatro cambios de la disolución de diálisis (≈ 250 ml), la muestra (15-20 ml) se concentró hasta un volumen inferior a 1 ml mediante ciclos de centrifugación a 4°C de 20 min cada uno, utilizando concentradores de tipo Centriprep (Ultracel®YM-30) y Amicon®Ultra (Ultracel-30) de Millipore y siguiendo las instrucciones del fabricante en cuanto a velocidad de centrifugación y volumen de muestra. La muestra de RT concentrada se almacenó a -20°C.

#### **3.4.2. Expresión y purificación de la RT del MLV**

##### **3.4.2.1. Expresión de la RT del MLV**

Se inocularon 300 ml de 2xYT (medio que contiene 16 g de bactotripton, 10 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por litro) conteniendo kanamicina a 50 µg/ml con 10 µl de un pre-cultivo de bacterias *E. coli* BL21, previamente transformadas con el plásmido pMuLVRT. El cultivo se mantuvo en agitación constante toda la noche a 37°C. A

continuación, se repartió el cultivo anterior en 3 matraces, con 1 litro cada uno de medio fresco (LB con kanamicina) y se dejó crecer las bacterias a 37°C y en agitación constante hasta alcanzar una  $A_{600}$  de 0,5, momento en el que se indujo la expresión de la RT añadiendo IPTG a una concentración final de 0,6 mM. El cultivo se dejó en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 2 h, y por último, se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 30 min a 4°C, utilizando un rotor JLA-10500 (Beckman Coulter™).

#### **3.4.2.2. Lisis celular**

Las bacterias recogidas en el paso anterior se lisaron añadiendo 2 ml por gramo de células de tampón Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), conteniendo sacarosa al 10%, PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM y lisozima 1 mg/ml. La mezcla se dejó en agitación a 4°C durante 15 min y se añadieron 20 ml de tampón NP-40 al 0,8%, conteniendo DTT 20 mM, PMSF 1 mM y benzamidina 2 mM. De nuevo se dejó en agitación a 4°C y se añadió NaCl a una concentración final de 0,5 M. Finalmente, se sonicó y se centrifugó la muestra en las condiciones descritas en el apartado 3.4.1.2.

#### **3.4.2.3. Cromatografía de afinidad**

Tras la centrifugación se desechó el sedimento y el sobrenadante se diluyó 7 veces en tampón Tris-HCl 40 mM, (pH 7,0), conteniendo NaCl 0,5 M. La mezcla se pasó por una columna de  $Ni^{2+}$ -ácido nitriloacético-agarosa (ProBond™, Invitrogen) previamente equilibrada con el mismo tampón con el que se diluyó la muestra. La muestra diluida se pasó varias veces a través de la columna para conseguir el mayor rendimiento posible, y se eluyó la enzima retenida con un gradiente de imidazol preparado con 20 ml de tampón Tris-HCl 40 mM (pH 7,9), que contenía NaCl 0,5 M y 20 ml de tampón Tris-HCl 40 mM (pH 7,9), que contenía NaCl 0,5 M e imidazol 1 M. Se recogieron fracciones de 2 ml y se midió su absorbancia a 280 nm. Finalmente, se juntaron las fracciones que contenían proteína.

#### **3.4.2.4. Cromatografía de intercambio iónico**

A continuación, se realizó una última cromatografía que nos permitió la separación de distintas moléculas presentes en la muestra en función de su carga. Se pasó la muestra por una columna de intercambio iónico (Q-Sepharose®-High performance, Pharmacia Biotech), previamente equilibrada con el tampón de dilución de la muestra

[Tris-HCl 40 mM (pH 7,9), que contenía NaCl 0,5 M]. Se recogieron fracciones y se juntaron aquellas que contenían la proteína. Los pasos de diálisis y concentración de la muestra se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.4.

### 3.4.3. Análisis de pureza y determinación de la concentración de las enzimas

La pureza de las RTs purificadas se determinó en geles de poliacrilamida y SDS. Además, utilizando estos geles, también se hizo una estimación aproximada de la concentración de la enzima, en base a las intensidades de las bandas p66 y p51, y su comparación con la intensidad de las bandas correspondientes a distintas cantidades de BSA, utilizadas como referencia. Por otro lado, también se determinó la concentración de la proteína en base a su coeficiente de extinción molar a 280 nm;  $\epsilon_{280} = 260450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  en el caso de la RT del VIH-1 de grupo M subtipo B;  $\epsilon_{280} = 284790 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para la RT del VIH-1 de grupo O y  $\epsilon_{280} = 100480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para las RTs del MLV y del XMRV.

### 3.5. Preparación de complejos heteropoliméricos

Los complejos molde-iniciador DNA/DNA o RNA/DNA heteropoliméricos utilizados en este trabajo se detallan en la **Tabla 7**. Los oligonucleótidos fueron sintetizados y purificados por HPLC en Invitrogen Life Technologies.

**Tabla 7. Complejos heteropoliméricos utilizados en los ensayos.**

Nombre	Oligonucleótidos
<b>D38</b> (38) <b>25PGA</b> (25)	5' GGGTCCTTTCTTACCTGCAAGAATGTATAGCCCTACCA 3' 3' GGACGTTCTTACATATCGGGATGGT 5'
<b>31T</b> (31) <b>21P</b> (21) <b>21PT</b> (21) <b>21PG</b> (21)	5' TTTTTTTTATAGGATACATATGGTTAAAGTAT 3' 3' CCTATGTATACCAATTTTCATA 5' 3' TCTATGTATACCAATTTTCATA 5' 3' GCTATGTATACCAATTTTCATA 5'
<b>M54</b> (54) <b>3TRP</b> (22)	5' CCCATACAAAAGGAAACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACA 3' 3' CTGTCTCATAACCGTTCCGGTGT 5'

<sup>a</sup> Nombre de los distintos complejos y entre paréntesis su tamaño en número de bases. Arriba se indican los moldes (negro), y debajo los iniciadores o "primers" (gris).

<sup>b</sup> Secuencias mostradas con la orientación correcta para la formación del híbrido, orientación 5'→3' para los moldes y 3'→5' para los iniciadores.



Los iniciadores se marcaron en su extremo 5' con 1  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer). La reacción de marcaje de los iniciadores se realizó con 5 U de polinucleótido quinasa T4 (Promega) en presencia de tampón Tris-HCl 70 mM (pH 7,5), que contenía MgCl<sub>2</sub> 10 mM y DTT 5 mM. Tras incubar durante 45 min a 37°C se verificó la incorporación de fosfato radiactivo al oligonucleótido mediante una cromatografía de capa fina sobre placas de polietilenimina-celulosa (PEI-celulosa) (TLC, 20x20 cm; Merck), utilizando para su separación fosfato disódico 0,5 M. Posteriormente, se inactivó la polinucleótido quinasa mediante una incubación de 10 min a 90°C.

Dependiendo del tipo de ensayo para el que fueron destinados los distintos oligonucleótidos, se utilizaron distintas condiciones a la hora de preparar los híbridos. Así, por ejemplo, para los ensayos de enzima activa, los complejos molde-iniciador se hibridaron en una solución de NaCl 150 mM y acetato de magnesio 150 mM, mediante incubación a 95°C durante 4 min y posterior enfriamiento lento hasta alcanzar la temperatura ambiente. Previo a su uso, se diluyó el complejo molde-iniciador a la concentración deseada en tampón Hepes (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico) 500 mM (pH 7,0), que contenía NaCl 150 mM y acetato de magnesio 150 mM (concentraciones finales). La hibridación de los complejos molde-iniciador utilizados para procesividad y ensayos de extensión en ausencia de un dNTP se realizó en las mismas condiciones de tiempo y temperatura pero formando el híbrido en un tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) que contenía MgCl<sub>2</sub> 4 mM, KCl 100 mM y DTT 2 mM. Por último, se realizó un tercer tipo de hibridación para los ensayos cinéticos llevados a cabo en el estado pre-estacionario para determinar fidelidad de copia, en los cuales el complejo se formó en ausencia de sales y bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura que se usaron en las anteriores hibridaciones. La concentración a la que se prepara el híbrido dependió de lo requerido por cada tipo de ensayo.

### **3.6. Determinación de la concentración de enzima activa**

Antes de comenzar la caracterización de las enzimas se determinó su actividad DNA polimerasa, utilizando el molde-iniciador D38-25PGA, preparado según los pasos descritos en el apartado anterior.

El ensayo se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l. Se incubó una mezcla preparada con 10  $\mu$ l de una disolución de RT (12 nM) y el híbrido a una concentración 60 nM en tampón Hepes 100 mM (pH 7,0), conteniendo acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM, polietilenglicol 6000 al 5%, NaCl 30 mM y acetato magnésico 30 mM. Tras una pre-

incubación de 10 min a 37°C, se añadieron 10 µl del nucleótido correcto a incorporar en la posición +1 del iniciador (en el caso de D38/25PGA será el dTTP). El nucleótido se añadió disuelto a una concentración de 1 mM en una solución acuosa de acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5%.

Se recogieron alícuotas de 4 µl a los 10, 20, 30 y 40 s del inicio de la reacción se mezclaron con 4 µl de solución de parada de la reacción [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)] y se incubaron durante 10 min a 90°C para inactivar la enzima. Los productos de las reacciones se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida al 20% que contenían urea 8 M.

Los geles se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y se midió la intensidad de las bandas correspondientes al iniciador elongado y sin elongar en el analizador de imagen BAS1500 (Fujifilm), utilizando el programa Tina versión 2.09 (Raytest Isopenmessgerate GmbH, Straubenhardt, Germany). Se representaron los valores correspondientes al porcentaje del iniciador total elongado a los distintos tiempos de incubación (10, 20, 30 y 40 s), ajustándose a la ecuación de la recta  $y=ax+b$ , donde  $y$  es el porcentaje de iniciador elongado, y  $x$  es el tiempo de reacción transcurrido. El parámetro  $b$  representa el porcentaje de molde-iniciador unido a la RT a tiempo cero. El porcentaje multiplicado por la concentración de híbrido en el ensayo es igual a la concentración de enzima activa en el mismo.

### 3.7. Ensayos de extensión de iniciadores en ausencia de un dNTP

Para la realización de estos ensayos se utilizó el complejo M54/3TPR (**Tabla 7**) a una concentración de 30 nM y las RTs analizadas a una concentración de 12 nM. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl de tampón Hepes 50 mM, (pH 7,0), que contenía NaCl 15 mM, acetato magnésico 15 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5%. Después de pre-incubar la enzima y el complejo molde-iniciador durante 10 min a 37°C, se añadió una mezcla con los nucleótidos correspondientes y la reacción se mantuvo a 37°C. Tras las correspondientes incubaciones, la reacción se detuvo añadiendo solución de parada e incubando la mezcla posteriormente durante 10 min a 90°C.

Las mezclas de dNTPs utilizadas fueron: (\*) dATP + dCTP + dGTP + dTTP; (-G) dATP + dCTP + dTTP; (-A) dCTP + dGTP + dTTP; (-T) dATP + dCTP + dGTP; (-C) dATP

+ dGTP + dTTP. La concentración final fue de 500  $\mu$ M para cada nucleótido. Los productos de las reacciones se resolvieron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 20% que contenían urea 8 M. los productos obtenidos se cuantificaron con un analizador de imagen BAS1500 (Fujifilm), tal como se ha descrito previamente.

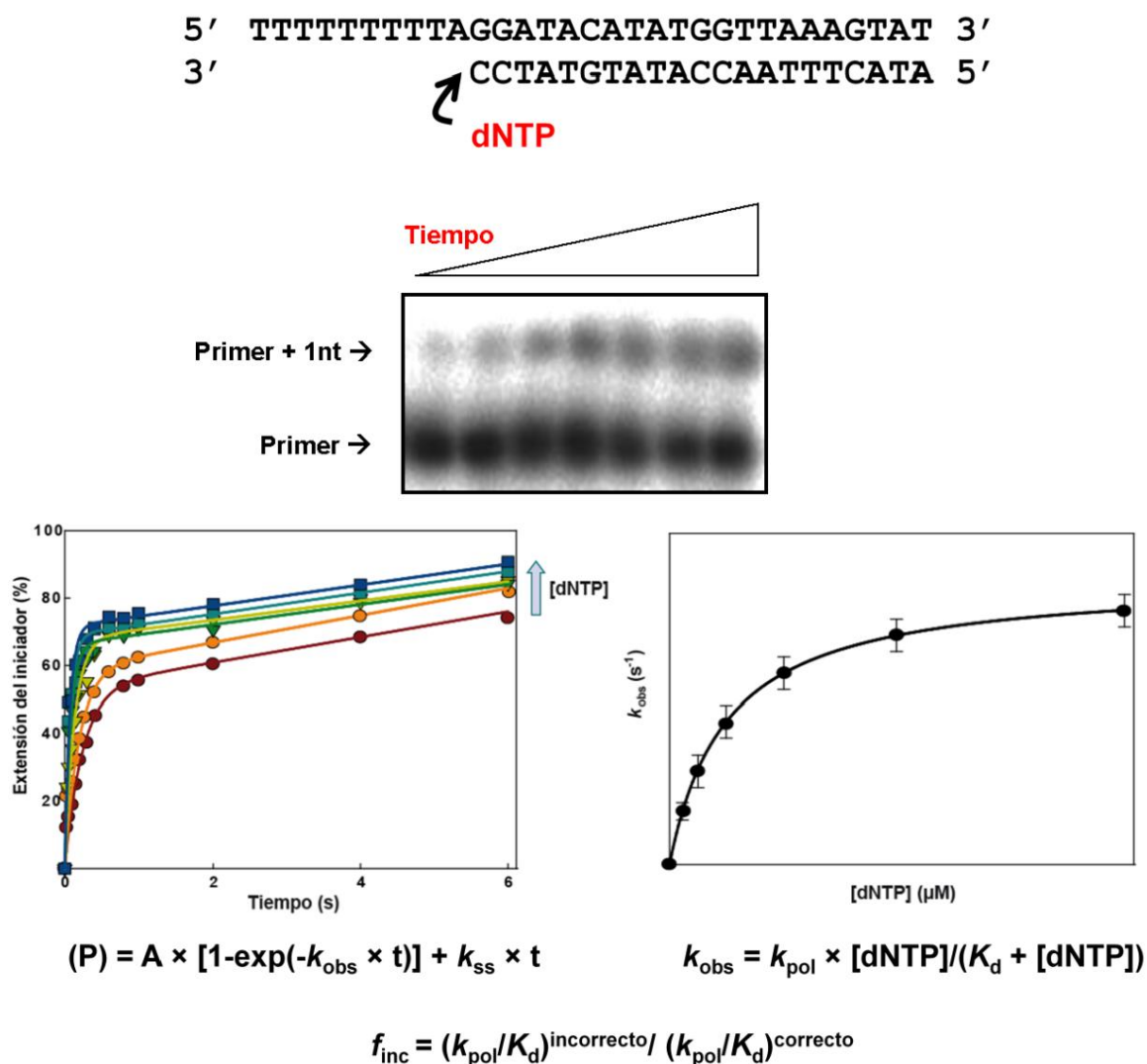
### **3.8. Ensayos cinéticos en el estado pre-estacionario para la determinación de la fidelidad de copia**

#### **3.8.1. Incorporación del dNTP correcto**

Usando este método se determinaron los parámetros cinéticos en el estado preestacionario, para la incorporación del nucleótido correcto en un complejo molde-iniciador correctamente apareado. Se usó el complejo 31T/21P siendo el dTTP el nucleótido correcto en este caso (**Figura 15**). El complejo 31T/21P se obtuvo siguiendo el proceso descrito en el apartado 3.5.

Los ensayos se realizaron utilizando un aparato de “Quench Flow” modelo QFM-400 (Bio-Logic Science Instruments), que permite la mezcla de dos reactivos durante un intervalo de tiempo corto (entre 20 ms y 6 s), tras el cual se produce la parada de la reacción por la adición de un agente químico (EDTA en este caso).

Para llevar a cabo la reacción se prepararon 12  $\mu$ l del tampón de reacción [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y KCl 50 mM], que contenía la enzima activa a una concentración de 100 nM y el complejo molde-iniciador a una concentración de 200 nM. La reacción se inició con la adición a la mezcla anterior de otros 12  $\mu$ l de concentraciones crecientes de dTTP en el mismo tampón y en presencia de 24 mM de  $MgCl_2$ . Las reacciones se detuvieron añadiendo 12  $\mu$ l de EDTA 0,9 M a distintos tiempos en un intervalo comprendido entre 25 y 6000 ms, incubándose a continuación las muestras durante 10 min a 90°C para inactivar la enzima. Los productos de reacción se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% en presencia de urea 8 M. Los resultados se obtuvieron exponiendo los geles a placas fotosensibles, utilizando un analizador de imagen BAS1500 (Fujifilm), tal como se ha detallado previamente.



**Figura 15. Determinación de la fidelidad de copia mediante ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido sobre un complejo molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico, en estado pre-estacionario.** En el estado pre-estacionario los productos de las reacciones obtenidos a los distintos tiempos (gel de la figura), y a diferentes concentraciones del dNTP estudiado (gráfico de la izquierda) son densitometrados, obteniéndose el porcentaje de iniciador elongado en la posición +1. Los resultados se ajustan a la ecuación de la izquierda, donde A es la amplitud, t es el tiempo de reacción,  $k_{\text{obs}}$  es la constante aparente de formación del enlace fosfodiéster y  $k_{\text{ss}}$  es la tasa de recambio de la enzima. La dependencia de  $k_{\text{obs}}$  con la concentración de dNTP viene dada por la ecuación hiperbólica de la derecha, donde  $k_{\text{pol}}$  y  $K_d$  son las constantes catalítica y de afinidad para la incorporación del dNTP, respectivamente. La eficiencia de incorporación errónea ( $f_{\text{inc}}$ ) se obtiene usando el cociente entre las constantes anteriores ( $k_{\text{pol}}/K_d$ ) para el nucleótido incorrecto respecto al cociente del correcto.

La cantidad de iniciador elongado ([P]), obtenido a lo largo de los diferentes tiempos de reacción se ajustó a la ecuación:

$$[P] = A \times [1 - \exp(-k_{\text{obs}} \times t)] + k_{\text{ss}} \times t \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde A es la amplitud, t es el tiempo de reacción,  $k_{\text{obs}}$  es la constante aparente de formación del enlace fosfodiéster y  $k_{\text{ss}}$  es la tasa de recambio de la enzima, es decir, la constante cinética de la fase lineal del estado estacionario.

La dependencia de la  $k_{\text{obs}}$  con la concentración de dNTP viene dada por la ecuación hiperbólica:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{pol}} \times [\text{dNTP}] / (K_d + [\text{dNTP}]) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde  $k_{\text{pol}}$  y  $K_d$  son las constantes catalítica y de afinidad para la incorporación del dNTP. El ajuste de los datos se realizó con el programa Sigma Plot 2011 (Systat Software, Inc.).

### 3.8.2. Incorporación de dNTPs incorrectos

En estos ensayos se determinaron los parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos incorrectos a un complejo molde-iniciador correctamente apareado en su extremo 3'. Se utilizó de nuevo el complejo 31T/21P, y los nucleótidos incorrectos a incorporar en la posición +1 del iniciador que fueron dATP, dCTP y dGTP.

El ensayo se realizó manualmente ya que los tiempos de reacción en el caso de la caracterización de la incorporación de un dNTP incorrecto son más largos. La reacción se llevó a cabo en 40 µl de tampón de reacción [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y KCl 50 mM]. En este ensayo, la concentración final de enzima fue de 120 nM y la concentración del complejo molde-iniciador fue de 100 nM.

Tras la preincubación de la enzima con el complejo molde-iniciador durante 10 min a 37°C, se añadió el tampón de reacción conteniendo concentraciones crecientes del nucleótido y MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 12 a 24 mM. Se recogieron alícuotas de 4 µl a distintos tiempos y se detuvo la reacción con 4 µl de solución de parada e incubando las muestras 10 min a 37°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% en presencia de urea 8 M. El análisis de los datos se realizó según se describe en el apartado 3.8.1. Los porcentajes de iniciador elongado ([P]) obtenidos a los distintos tiempos de reacción se ajustaron a la ecuación:

$$[P] = A \times [1 - \exp(-k_{\text{obs}} \times t)] \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde A es la amplitud, t es el tiempo de reacción y  $k_{\text{obs}}$  es la constante aparente de formación del enlace fosfodiéster. Con las condiciones usadas en el ensayo, es decir, una concentración de enzima mayor que la concentración del complejo molde-iniciador, se eliminaría la influencia de la tasa de recambio de la enzima ( $k_{\text{ss}}$ ), que podría interferir en las determinaciones de las constantes cinéticas obtenidas a baja velocidad de incorporación.

La determinación de  $K_d$  y  $k_{\text{pol}}$  para cada enzima y el correspondiente nucleótido se llevó a cabo usando la ecuación 2. De esta manera se obtuvo una estimación de la fidelidad de copia de la RT comparando las eficacias catalíticas, o la relación entre las constantes catalítica y de afinidad, ( $k_{\text{pol}}/K_d$ ), obtenidas para los nucleótidos incorrectos, respecto a la  $k_{\text{pol}}/K_d$  obtenida para el nucleótido correcto. La eficiencia de incorporación ( $f_{\text{inc}}$ ) de nucleótidos erróneos es la constante que nos da el valor de fidelidad, y se define como:

$$f_{\text{inc}} = [(k_{\text{pol}}/K_d)(\text{nucleótido incorrecto}) / (k_{\text{pol}}/K_d)(\text{nucleótido correcto})]$$

### 3.8.3. Extensión de extremos desapareados

Para la determinación de los parámetros cinéticos correspondientes a la incorporación del nucleótido correcto sobre un complejo molde-iniciador con el extremo 3' del iniciador desapareado, se utilizaron los complejos 31T/21PT, 31T/21PG y 31T/21PA, y dTTP como sustrato.

Debido a la rapidez de la reacción de incorporación de nucleótidos, en algunos de estos ensayos se necesitó usar el aparato de “Quench Flow” modelo QFM-400, aunque los ensayos se realizaron manualmente, siempre que el tiempo de incorporación no fuese inferior a los 8 s.

La concentración de enzima activa fue de 120 nM y la concentración de complejo molde-iniciador 100 nM. Las reacciones, el procesamiento y análisis de datos se realizó según lo explicado en el apartado anterior. En este caso la constante que refleja la medida de fidelidad es la eficiencia de la enzima en la extensión de extremos desapareados ( $f_{\text{ext}}$ ), definida por la expresión:

$$f_{\text{ext}} = [(k_{\text{pol}}/K_d) (\text{extremo 3' desapareado}) / (k_{\text{pol}}/K_d) (\text{extremo 3' correctamente apareado})]$$

### 3.9. Procesividad

La procesividad de las enzimas se midió usando DNA de cadena sencilla (ssDNA) del fago M13mp2 como molde y el oligonucleótido Rtr174/17 como iniciador (5'-TGTTGGGAAGGGCGATC-3'). El oligonucleótido Rtr174/17 hibrida con el ssDNA entre las posiciones +174 y +190 del gen *lacZ*. El ensayo se realizó en un volumen final de 50 µl de tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) que contenía MgCl<sub>2</sub> 4 mM, KCl 100 mM y DTT 2 mM, con 40 nM de RT, 30 nM del híbrido, 50 µM de cada uno de los cuatro dNTPs y 5 mg/ml de heparina (usado como "trap" en el ensayo). Se realizó una preincubación de la enzima y el híbrido a 37°C durante 10 min y después se añadió la mezcla que contenía los dNTPs y la heparina. Se recogieron muestras a los 15, 30 y 60 min, deteniéndose la reacción con la solución de parada (formamida al 90%, que contenía EDTA 10 mM, azul bromofenol al 0,1% y xilencianol al 0,1%). Los productos de la reacción se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% y urea 8 M.

En el ensayo se realizaron dos controles, uno para comprobar que el "trap" utilizado era capaz de impedir la polimerización por parte de la RT, y otro para verificar que la RT consigue extender por completo el iniciador en ausencia del "trap". La determinación de qué concentración de heparina era suficiente para impedir la polimerización se llevó a cabo en las mismas condiciones que el ensayo de procesividad, con la variación de que en la pre-incubación solo estaban presentes la enzima y el "trap", y tras los 10 min de pre-incubación se añadió el híbrido junto con los dNTPs. El control de la extensión total se realizó del mismo modo, pero sin añadir heparina a la mezcla.

### 3.10. Determinación de la actividad de la RT a distintas temperaturas usando sustratos homopoliméricos

Los ensayos para la determinación de la actividad ADN polimerasa RNA-dependiente con sustratos homopoliméricos se realizaron con el molde-iniciador poly(rA)/oligo(dT)<sub>16</sub>.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 100 µl, en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), que contenía NaCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 8 mM, [<sup>3</sup>H]dTTP (6-8 µCi/ml; 120-160 Ci/mol) y molde-iniciador a 1 µM. Se preincubó la enzima y el molde-iniciador a las distintas temperaturas de estudio (37, 42, 46, 48, 50, 52, 54, 56 y 58°C) durante 5 min en una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), que contenía NaCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y DTT 8 mM. Transcurrido este tiempo, se dejaron las muestras en hielo durante otros 5 min. Posteriormente se incubaron a 37°C y se inició la reacción añadiendo el nucleótido

correcto a incorporar en la posición +1 del iniciador (dTTP), disuelto en una solución que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y DTT 8 mM.

Se recogieron alícuotas de 27 µl a los 5, 10 y 15 min, para comprobar que las condiciones de la reacción de incorporación estaban en la fase lineal. La reacción se detuvo con 27 µl de EDTA 0,5 M y los productos de reacción se dejaron en hielo.

Para el procesamiento de las muestras se añadieron a cada una de ellas 5 µl de DNA de esperma de salmón a 10 mg/ml (usado como “trap” en el ensayo) y 600 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Se incubaron las muestras durante 20-30 min a 4°C y a continuación se añadió la totalidad de la muestra sobre filtros de papel Whatman previamente empapados en TCA al 5% y colocados en un matraz conectado a un sistema de vacío. Se realizaron cuatro lavados con TCA al 5% y uno con etanol 70%. El DNA marcado coprecipita con el DNA de esperma de salmón y por tanto queda retenido en el filtro. Los filtros con la muestra retenida se dejaron secar a 70°C durante 2 h. Finalmente, se midió la actividad enzimática por la cantidad de tritio incorporado en el complejo poly(rA)/oligo(dT)<sub>16</sub>. Se midieron las cuentas por minuto (cpm) que tenía cada muestra en un contador de centelleo (1209 Rackbeta, Wallace).

A partir de los valores obtenidos (cpm) se estimaron los picomoles incorporados por minuto a las distintas temperaturas estudiadas. Al dato obtenido para cada enzima a 37°C se le dio el valor del 100% de la incorporación realizada por dicha enzima y se ajustaron los datos del resto de las temperaturas. Finalmente, la media y desviación obtenidas de 3 ensayos independientes para cada enzima se representaron para su análisis en un diagrama de barras.

### **3.11. RT-PCR a distintas temperaturas**

El estudio de eficiencia catalítica de las RTs a distintas temperaturas se realizó mediante RT-PCR, con un paso inicial de síntesis de cDNA a la temperatura estudiada y una posterior amplificación por PCR. La reacción de retrotranscripción se realizó en un volumen final de 20 µl en un tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), que contenía KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 10 mM, 1 U/µl de inhibidor de ribonucleasas (RNasin® Plus, Promega) y los cuatro dNTPs, cada uno de ellos a 500 µM. Se utilizó como iniciador un oligo(dT)<sub>16</sub> a 5 µM y como molde RNA total de hígado de ratón (Stratagene) a 50 ng/µl. La concentración final de enzima fue de 150 nM. El complejo molde-iniciador se formó



mediante una incubación a 68°C durante 3 min, seguida de un enfriamiento lento para favorecer la hibridación.

La reacción de síntesis de cDNA se realizó a distintas temperaturas (dentro del rango 37-70°C) durante 60 min y se paró por inactivación de la enzima mediante calentamiento a 95°C durante 10 min. Dos microlitros de cada cDNA sintetizado se utilizaron para la amplificación por PCR de fragmentos del gen de actina (900 pb) y tubulina (1200 pb), para lo que se diseñaron los primers ACT1, ACT3, TUB1 y TUB2 (Tabla 8).

**Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-PCR.**

Nombre		Oligonucleótido	
ACT1	5'	CCTAGGCACCAGGGTGTGAT	3'
ACT3	5'	CGTACTCCTGCTTGCTGATCC	3'
TUB1	5'	CTTCAGTGAGACAGGAGCTG	5'
TUB2	5'	CCACAGAATCCACACCAACC	5'

La amplificación utilizando los oligonucleótidos ACT1 y ACT3 da como resultado fragmentos de 900 pb. En el caso del gen de tubulina los oligonucleótidos están diseñados para dar fragmentos de un tamaño de 1200 pb.

La PCR se realizó en un volumen de 50 µl en presencia de dNTPs, cada uno de ellos a 200 µM, 200 ng de los oligonucleótidos correspondientes y 1,75 U de Expand High Fidelity DNA polymerase mix (Roche). Las condiciones de la amplificación fueron (1) una incubación a 95°C durante 2 min; (2) 30 ciclos de incubación a 95°C durante 30 s, 55°C durante 1 min y 72°C durante 2 min; y por último, (3) una incubación final a 72°C durante 10 min. Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 1%.

### 3.12. Ensayos genéticos

Se realizaron dos tipos de ensayos genéticos de introducción de mutaciones para medir la fidelidad de copia. Uno de ellos con molde DNA, con el que se estudió la fidelidad de copia de la actividad DNA polimerasa dependiente de DNA y otro ensayo, en el que se usó como molde RNA y por tanto se estudió la fidelidad en la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA. Aunque en ambos ensayos se utilizaron sustratos comunes, la metodología varía de uno a otro.

### 3.12.1. Ensayo genético para la determinación de fidelidad de síntesis de DNA utilizando DNA como molde

#### 3.12.1.1. Preparación del “gapped DNA”

Se utilizó la cepa NR9099 de *E. coli* [ $\Delta$ (*pro-lac*), *thi*, *ara*, *recA56/F'* (*proAB*, *lacI<sub>q</sub>* $\Delta$ M15)] para inocular 25 ml de medio 2xYT (bactotripton 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l y NaCl 5 g/l). El cultivo se creció durante aproximadamente 4 h a 37°C en agitación constante, hasta que alcanzó una absorbancia de 0,6 a 600 nm. Se añadieron 10 ml del precultivo en un litro de medio 2xYT fresco, y tras 2 h a 37°C y agitación constante, el cultivo se infectó con una placa aislada del bacteriófago M13mp2 en su forma silvestre, dejándolo crecer durante toda la noche.

Se recogieron las células mediante centrifugación a 4000 rpm durante 30 min, utilizando un rotor JLA-10500 (Beckman Coulter™). A partir del sedimento que contenía las bacterias se aisló la forma replicativa del fago M13mp2 (RFI), ya que la parte del ciclo en el que el DNA genómico del virus está en forma de doble cadena (dsDNA, RFI) tiene lugar dentro del hospedador. En el sobrenadante es donde está el fago libre, con su material genético encapsidado (DNA de cadena sencilla o ssDNA)

Se digirieron 100 µg de dsDNA con PvuII (New England BioLabs). Para ello se usaron 300 U de la endonucleasa de restricción en el tampón recomendado por el fabricante. El plásmido contiene 3 sitios de corte para la PvuII, por lo que tras 2 h de incubación a 37°C se obtuvieron 4 fragmentos de 6789, 268, 93 y 46 pares de bases (pb). El fragmento de 6789 pb se purificó tras una precipitación con etanol, seguida de una precipitación con polietilenglicol al 5% (Bebenek y Kunkel, 1995), lo que facilita la obtención fragmentos con un tamaño superior a 1650 bases (Lis, 1980).

Se usaron 5 µg del dsDNA de 6789 pb purificado para la formación del “gapped DNA”. Se diluyó el dsDNA cortado hasta dejarlo a una concentración final aproximada de 0,1 µg/µl para disminuir la fuerza iónica y facilitar así la separación de las hebras. A continuación se incubó durante 5 min a 70°C. Después se añadió el ssDNA en una proporción 1:1 respecto al dsDNA y se dejó la muestra a 70°C durante 2 min. Se incubó la muestra a 4°C y se añadió el tampón SSC 20X [citratato sódico 30 mM (pH 7,0), que contenía NaCl 300 mM] a una concentración final de citratato sódico 3 mM (pH 7,0) y NaCl 30 mM para facilitar la hibridación. Finalmente el “gapped DNA” se obtuvo por precipitación con etanol, y su concentración, tamaño y pureza se analizó en geles de agarosa al 0,8%.

### 3.12.1.2. Reacción de síntesis de DNA (rellenado del “gap”)

Se preincubaron 100 a 150 ng de “gapped DNA” a 60°C durante 5 min antes de comenzar la reacción para eliminar hibridaciones no deseadas entre las moléculas de DNA. Después se llevó a cabo la reacción durante una hora a 37°C en un tampón de reacción que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), KCl 100 mM, DTT 2 mM y MgCl<sub>2</sub> 4 mM, en presencia de una concentración de 250 µM de cada dNTP y 100 nM de RT en un volumen final de 25 µl. Se hicieron 10 reacciones en paralelo. Las reacciones se detuvieron añadiendo EDTA hasta una concentración final de 6 mM.

La eficacia de la reacción de relleno del “gap” se determinó tras una electroforesis a 65 V durante 16 h en geles de agarosa al 0,8% de dimensiones 15 cm x 25 cm. En estos geles se comparó el producto de la reacción de síntesis (RFIII) con la forma relajada de dsDNA (RFII), para distinguir entre el sustrato que presenta el “gap” relleno, del que no lo está (diferencia de 407 nt) (Bebenek y Kunkel, 1995).

### 3.12.1.3. Preparación de células competentes

Se inocularon 10 ml de medio 2xYT con una colonia de las bacterias *E. coli* MC1061 [*hsdR*, *hsdM*<sup>+</sup>, *araD*,  $\Delta$ (*ara*, *leu*),  $\Delta$ (*lacI*POZY), *galU*, *galK*, *strA*] y se dejó toda la noche a 37°C en agitación constante. A continuación se añadió el cultivo obtenido a 500 ml de medio 2xYT fresco y se mantuvo en las mismas condiciones durante 2 h. Se añadieron otros 500 ml de medio 2xYT, y se mantuvo el crecimiento hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó valores entre 0,5 y 0,8. El cultivo se enfrió en hielo durante 30 min y se recogieron las células mediante centrifugación a 4000xg durante 30 min a 4°C, utilizando un rotor JLA-10500 (Beckman Coulter™). El sedimento bacteriano se resuspendió en 1 litro de agua estéril a 4°C y a continuación se centrifugó de nuevo a 2200xg durante 20 min en las mismas condiciones, repitiéndose dos veces esta operación. Seguidamente, el sedimento se resuspendió en 20 ml de glicerol al 10% frío y se realizó una última centrifugación a 3000xg durante 15 min. Por último, se resuspendió el precipitado en 3 ml de glicerol al 10% y se hicieron alícuotas de 50 µl que se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

### 3.12.1.4. Electroporación y plaqueo

Se añadió 1 µl del producto de reacción de síntesis (“gapped DNA” completo) a una alícuota de 50 µl de las bacterias electrocompetentes *E. coli* MC1061. Transcurridos 3 min en hielo, la mezcla se transfirió a una cubeta de 0,2 cm en la que se llevó a cabo la electroporación utilizando un equipo Bio-Rad “Gene Pulser”. Las constantes utilizadas

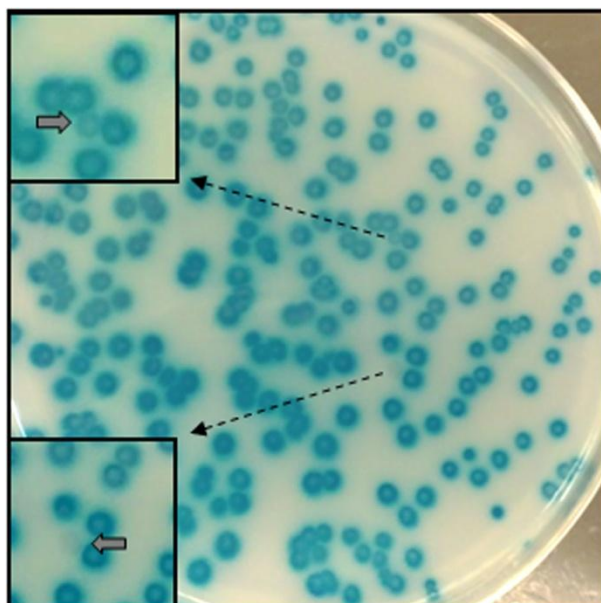
fueron 2,5 kV, 400  $\Omega$  y 25  $\mu$ F. En el pulso de las bacterias sin presencia de DNA la constante de tiempo que resulta es de 5 ms. Cuando electroporamos DNA, esta constante nos marca la cantidad idónea de DNA que debemos utilizar para una óptima electroporación. Inmediatamente después, se añadieron 0,5 ml de medio SOC (bactotripton 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 2,5 mM,  $MgCl_2$  20 mM,  $MgSO_4$  20 mM y glucosa 20 mM).

El plaqueo se realizó en medio M9 (Bebenek y Kunkel, 1995). Para hacer la mezcla del plaqueo se usaron 2,5 ml de “soft-agar” (NaCl al 0,9% y bactoagar al 0,8%) precalentado a 48°C, en el se añadieron entre 25-75  $\mu$ l del electroporado, 500  $\mu$ g de IPTG, 2,5 mg de X-Gal y 0,5 ml de un cultivo en fase logarítmica de células *E. coli* CSH50 [ $\Delta$ (*pro-lac*), *thi*, *ara*, *strA/F'* (*proAB*, *lacI<sub>q</sub>* $\Delta$ M15, *traD36*)] (cepa responsable de la  $\alpha$ -complementación).

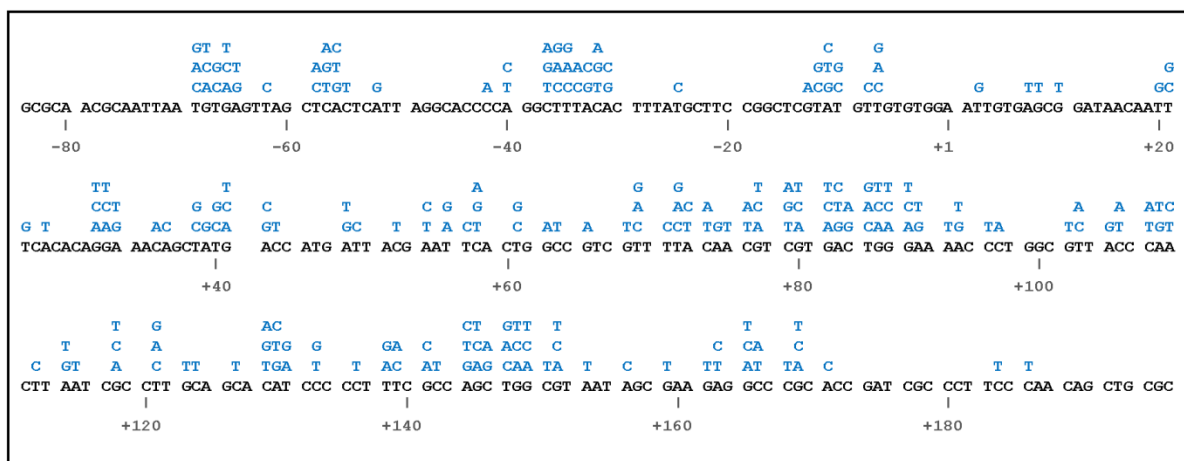
Se añadió la mezcla anterior a placas Petri y se dejó enfriar hasta solidificar. Las placas se incubaron durante 15-18 h a 37°C. Al analizar los plaques se observaron placas de infección con los diversos fenotipos: placas con fenotipo azul oscuro (WT) y placas con fenotipos azules menos intensos que el fenotipo del WT, en una gradación de tonalidades hasta llegar a transparentes (la gradación de tonalidad de azules se describe con los números +3, +2, +1 y 0, siendo +3 el mutante con el fenotipo más parecido al WT, con el 100% de actividad  $\beta$ -galactosidasa, y 0 el mutante transparente y carente de actividad) (**Figura 16**).

#### 3.12.1.5. Selección de mutantes y análisis de mutaciones

Se aislaron las placas con fenotipos mutantes (azul pálido o incoloras) y se conservaron a -20°C en NaCl al 0,9%. Una vez identificadas las placas mutantes, se realizó el recuento de placas totales y se llevó a cabo la extracción del DNA mutante utilizando el kit “Wizard Plus SV MinPreps” (Promega). El gen *lacZ* en el DNA del fago obtenido se secuenció utilizando el oligonucleótido LacZUP (5'-GCTTGCTGCAACTCTCTCAG-3') a través del servicio de Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Se determinaron las mutaciones que producen el cambio fenotípico de la actividad  $\beta$ -galactosidasa utilizando como referencia el esquema mostrado en la **Figura 17**.



**Figura 16.** Imagen de una placa M9 resultante del ensayo genético de introducción de mutaciones. Se observan distintos fenotipos en las placas formadas por el fago, donde mayoritariamente se observa un fenotipo WT azul oscuro. En la ampliación superior aparece una placa con fenotipo +2, y en la ampliación inferior una con fenotipo 0.



**Figura 17.** Representación del gen *lacZ* y todas las posiciones en las que la mutación indicada produce un cambio fenotípico detectable. Las sustituciones de base están representadas en azul sobre la secuencia “wild-type” de la cadena positiva de DNA del gen *lacZ* (Bebenek y Kunkel, 1995).

### 3.12.2. Ensayo genético para la determinación de fidelidad de síntesis de DNA utilizando como molde RNA

#### 3.12.2.1. Construcción del molde RNA

Se utilizó un DNA del fago M13mp2 modificado, en el que el promotor de la RNA polimerasa del fago T7 se había colocado junto al extremo 5' ("up-stream") del gen *lacZ* $\alpha$ , entre las bases -112 y -113 (Boyer *et al.*, 1992). La obtención del plásmido que contiene el promotor del fago T7 se realizó siguiendo el procedimiento descrito para RFI y explicado en el apartado 3.12.1.1, dedicado a la preparación del "gapped" DNA. El DNA de doble cadena con el promotor se cortó mediante digestión con 3 U de FspI (New England Biolabs) por microgramo de DNA, en las condiciones indicadas por el fabricante. El único sitio de corte para esta enzima se encuentra en la posición +195 de la región *lacZ* del plásmido. Tras la digestión se realizó una extracción estándar con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar la enzima y, a continuación, una precipitación con etanol para eliminar sales. El DNA obtenido se resuspendió en agua estéril libre de RNasas.

Para la obtención de RNA se realizó una reacción de transcripción en la que se utilizaron entre 2 y 10  $\mu$ g de DNA lineal portador del promotor de la RNA polimerasa del fago T7, en un volumen final de 50  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), que contenía  $MgCl_2$  6 mM, espermidina 2 mM, NaCl 10 mM, DTT 10 mM, 1 U/ $\mu$ l de inhibidor de ribonucleasa (RNasin, Promega), 500  $\mu$ M de cada ribonucleótido y 38 U de RNA polimerasa del fago T7 (Promega). Se incubó la reacción a 37°C durante 2 h.

Para eliminar el DNA molde se digirió la muestra con 1 U de DNasa (RQ1 RNasa-free DNase, Promega) por cada  $\mu$ g de DNA. Tras una incubación de 15 min a 37°C se purificó el RNA mediante una extracción con fenol:cloroformo, seguida de una precipitación con etanol en presencia de acetato amónico 2,5 M, para facilitar la eliminación de nucleótidos libres. El RNA puro se conservó disuelto en agua a -80°C. Se confirmó que se trataba de un RNA de 313 bases (el extremo 5' corresponde a la posición -118 del gen *lacZ* y el extremo 3' a la posición +195) en un gel de agarosa al 1%, usando como referencia marcadores de RNA de 0,1 kb a 1 kb (Novagen).

#### 3.12.2.2. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó en un tampón de reacción que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), KCl 100 mM, DTT 2 mM y  $MgCl_2$  4 mM, en presencia de inhibidor de

ribonucleasa (RNasin, Promega) y una concentración de 250  $\mu$ M de cada dNTP. Se usó una concentración de enzima de 100 nM, 1 pmol de RNA y una concentración de oligonucleótido de DNA (Rtr174) dos veces superior a la concentración de RNA. Para cuantificar el cDNA sintetizado se realiza en paralelo otra reacción en las mismas condiciones en presencia de 1  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ - $^{32}$ P] dCTP. Con esta muestra también se comprobó que el tamaño del cDNA era el correcto (309 bases), comparándola con el resultado de una reacción de secuenciación. Esta reacción se realizó con la polimerasa Sequenase<sup>TM</sup> Version 2.0 (USB) y se usó como molde el DNA de cadena sencilla del fago M13mp2 y como oligonucleótido el iniciador Rtr174.

Antes de comenzar la reacción de síntesis de cDNA se calentó el RNA a 65°C para evitar la presencia de estructuras secundarias en su secuencia, que pudieran evitar la hibridación con el oligonucleótido o la síntesis por parte de la RT. Una vez realizado este paso se añadieron el resto de los componentes y se dejó la reacción a 37°C durante 2 h, tras las que se detuvo la reacción añadiendo EDTA a una concentración final de 15 mM. El híbrido formado por el RNA molde y el cDNA recién sintetizado se desnaturalizaron a 80°C. A continuación, se digirió el RNA con un cóctel de RNasas (Ambion, nº de catálogo: AM2286) a 37°C durante 1 h, siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente se purificó el cDNA mediante una extracción con fenol y posterior precipitación con etanol. Se comprobó su tamaño y concentración en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y urea 8 M.

### **3.12.2.3. Fosforilación e hibridación**

Para que se pueda producir la ligación entre el cDNA obtenido y el extremo 3' del "gapped DNA" por parte de la maquinaria replicativa de la cepa MC1061, se fosforiló el extremo 5' del cDNA. Este paso se llevó a cabo en un volumen total de 50  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), que contenía MgCl<sub>2</sub> 10 mM, espermidina 1,5 mM, ATP 1 mM y 0,5 U de la polinucleótido quinasa del fago T4, por cada pmol de cDNA. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h y se detuvo mediante choque térmico a 65°C durante 5 min.

Por último, se realizó la hibridación del cDNA y el "gapped DNA", para lo que se utilizó un exceso de cDNA de 5 veces respecto a la concentración de "gapped DNA" utilizada, ya que el cDNA también hibrida con restos de ssDNA que pueden quedar en la muestra de gap y necesitamos garantizar que todo el "gapped DNA" queda hibridado. La mezcla se calentó a 70°C en una solución citrato sódico 3 mM (pH 7,0), que contenía

NaCl 30 mM y se dejó enfriar lentamente hasta llegar a temperatura ambiente. La obtención del híbrido correcto se confirmó en un gel de agarosa al 0,8%.

La molécula resultante contiene un gap de 104 nucleótidos que se extiende entre las posiciones -113 y -217 del plásmido que será completado por la maquinaria replicativa de la cepa de *E. coli* MC1061. Esta zona se encuentra en el extremo C-terminal del gen *lacI*, por lo que no es parte de la secuencia diana del *lacZ* en la  $\alpha$ -complementación que se usa en el ensayo para la detección de errores por atenuación/anulación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. A partir de este punto el ensayo continua con la preparación de las células competentes (3.12.1.3), electroporación y plaqueo (3.12.1.4) y finaliza con la selección de mutantes y análisis de mutaciones (3.12.1.5).



## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudio comparado de las RTs de oncorretrovirus (XMRV y MLV) y del virus de la inmunodeficiencia humana

La RT del MLV es una de las enzimas más utilizadas en biología molecular en técnicas de expresión génica. Su estructura monomérica la convierte en una enzima fácil de purificar y susceptible de mejora por mutagénesis dirigida. A esto se suma que es una enzima con una fidelidad de copia relativamente alta. Sin embargo, la RT del MLV muestra una clara tendencia a producir paradas durante la síntesis de DNA dependiente de molde RNA, originando productos truncados (DeStefano *et al.*, 1991; Harrison *et al.*, 1998). Estas pausas son debidas principalmente a las estructuras secundarias del RNA. Este problema se solventaría si se pudiese realizar la reacción de síntesis de cDNA a temperaturas en las que las estructuras secundarias del RNA no pudieran mantenerse, por ejemplo a temperaturas superiores a 55°C.

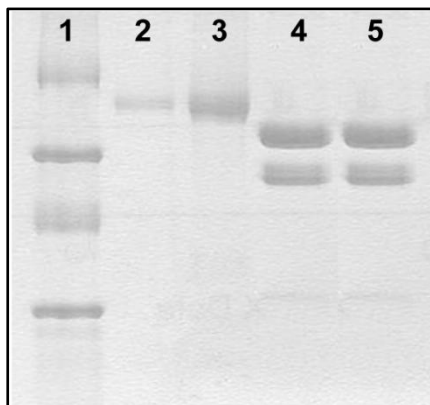
Partiendo de esta premisa, en el laboratorio se analizó la estabilidad que mostraban las RTs de *Lentivirus* y *Gammaretrovirus* a elevadas temperaturas. En los ensayos realizados se observó una mayor estabilidad a altas temperaturas de las RTs del VIH-1. Tanto la RT del VIH-1 de grupo M subtipo B (BH10\_WT) como la enzima de grupo O (O\_WT) mostraban una actividad DNA polimerasa dependiente de molde RNA mayor que la de la enzima del MLV en las reacciones de síntesis realizadas a temperaturas altas (Álvarez *et al.*, 2009).

Partiendo de esta base, llevamos a cabo una caracterización de la fidelidad de RTs de *Gammaretrovirus* como el MLV y el XMRV. La RT del MLV ha sido caracterizada previamente por otros laboratorios como enzima de alta fidelidad (Roberts *et al.*, 1988), por lo que comparamos su exactitud con la mostrada por las enzimas del VIH que mostraron una mayor estabilidad a temperaturas elevadas..

#### 4.1.1. Estudio de la actividad DNA polimerasa dependiente de DNA en ensayos de incorporación de nucleótidos correctos llevados a cabo en condiciones de estado pre-estacionario

Se realizó un estudio con dos RTs de virus del género *Gammaretrovirus* (la RT del MLV y la del XMRV), y dos RTs del VIH-1 clasificado en el género *Lentivirus* (las RTs BH10\_WT y O\_WT). Todas las enzimas fueron purificadas en condiciones similares, utilizando una cromatografía de intercambio iónico, seguida de una cromatografía de

afinidad. Las RTs del MLV y del XMRV se obtuvieron como polipéptidos de cadena sencilla de un tamaño aproximado de 75-80 kDa y con una cola de histidinas en su N-terminal. Por otro lado, las RTs del VIH-1 se obtuvieron como heterodímeros con la cola de histidinas en el extremo C-terminal de su subunidad mayor (p66). Las subunidades p66 y p51 de las RTs del VIH-1 presentaban tamaños de 66 y 51 kDa, respectivamente (Figura 18).



**Figura 18. Análisis de la pureza de las enzimas.** Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de las RTs purificadas: 1. Marcador de pesos moleculares cuyas bandas corresponden a: fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa). 2. RT del MLV. 3. RT del XMRV. 4. RT BH10\_WT. 5. RT O\_WT.

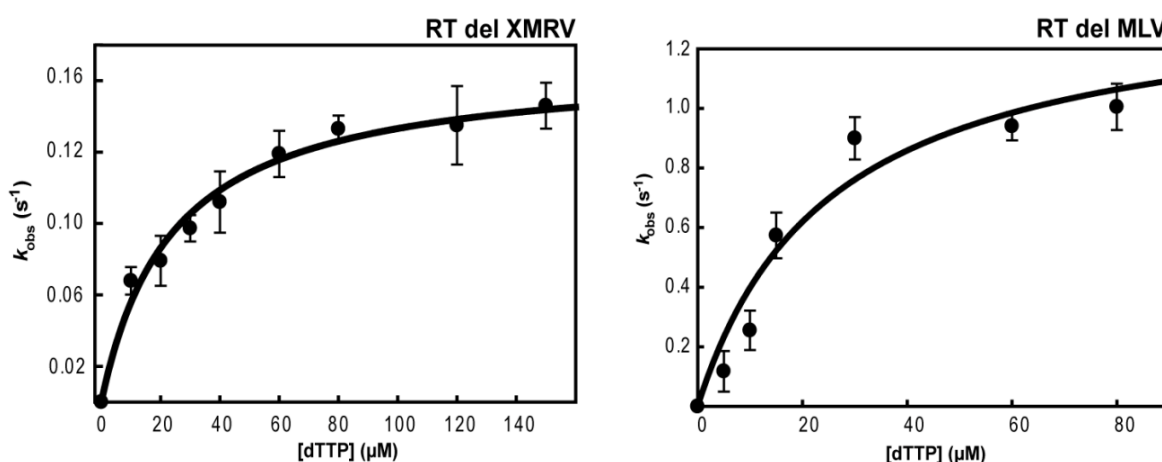
Una vez purificadas y determinada su concentración de enzima activa, se procedió a la comparación de su eficacia catalítica en ensayos de incorporación de nucleótido correcto llevados a cabo en condiciones de estado pre-estacionario. En estas condiciones se mide la actividad enzimática en escalas de tiempo muy pequeñas, en las que tiene lugar la incorporación del dNTP. Los parámetros cinéticos determinados en el estado pre-estacionario permiten sacar conclusiones acerca del mecanismo de la reacción, al permitirnos determinar la constante de afinidad aparente para la unión del nucleótido entrante ( $K_d$ ) y la velocidad máxima de incorporación de éste o constante catalítica ( $k_{pol}$ ).

Se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario para las RTs del XMRV y del MLV. En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P, cuya secuencia se muestra en la **Tabla 7**.

La velocidad de incorporación del nucleótido ( $k_{obs}$ ) se determinó en presencia de distintas concentraciones de dNTP. La dependencia de la velocidad de la reacción ( $k_{obs}$ ) con respecto a la concentración de nucleótido se analizó ajustando los datos a una ecuación hiperbólica. Así, se obtuvo la constante catalítica de polimerización para la incorporación de dNTP ( $k_{pol}$ ) y la constante de afinidad de unión del dNTP ( $K_d$ ) para las dos

enzimas estudiadas (**Figura 19**). En la **Tabla 9** se muestran los parámetros cinéticos obtenidos en el estado pre-estacionario, además de los correspondientes a las RTs del VIH-1 obtenidos previamente en el laboratorio (Álvarez *et al.*, 2009).

Los valores de  $K_d$  obtenidos con las dos RTs de *Gammaretrovirus* fueron muy similares. Sin embargo, sus eficiencias de incorporación fueron distintas debido a diferencias en sus constantes catalíticas de polimerización ( $k_{pol}$ ). La  $k_{pol}$  obtenida con la RT del XMRV fue 8 veces inferior a la de la RT del MLV.



**Figura 19. Cálculo de los parámetros cinéticos para la incorporación del nucleótido correcto en condiciones de estado pre-estacionario.** Se representa la dependencia de la constante de velocidad respecto a la concentración de dTTP en ensayos de incorporación de nucleótido sobre un complejo 31T/21P, por las RTs del XMRV y del MLV. Las velocidades de primer orden ( $k_{obs}$ ) obtenidas se representaron frente a la concentración de dTTP. Los datos se ajustaron a la ecuación hiperbólica:  $k_{obs} = k_{pol} \times [dNTP] / (K_d + [dNTP])$ . Así, se obtuvieron los parámetros  $k_{pol}$  y  $K_d$ . La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a la ecuación hiperbólica.

Las eficiencias catalíticas de las RTs de *Gammaretrovirus* fueron del orden de 100 veces más bajas que las obtenidas con las RTs del VIH-1 (**Tabla 9**). Estas diferencias de deben, especialmente, a que las enzimas del XMRV y del MLV presentaron una menor velocidad de polimerización ( $k_{pol}$ ). Además, estas RTs mostraron  $K_d$ s más altas, lo que implica que también tienen una menor afinidad por el dNTP.

**Tabla 9. Parámetros cinéticos de incorporación del nucleótido correcto para las RTs, determinados en condiciones de estado pre-estacionario.**

Enzima	$k_{pol}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_d$ (μM)	$k_{pol}/K_d$ (μM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )
XMRV	0,19 ± 0,02	24,1 ± 4,3	(7,83 ± 1,71) × 10 <sup>-3</sup>
MLV	1,55 ± 0,17	24,9 ± 7,1	(6,21 ± 1,88) × 10 <sup>-2</sup>
O_WT <sup>a</sup>	14,7 ± 1,0	11,8 ± 2,9	1,25 ± 0,32
BH10_WT <sup>a</sup>	11,6 ± 0,5	13,4 ± 1,9	0,86 ± 0,13

Se usó el complejo 31T/21P. Los datos se muestran como el valor medio ± desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se realizó de forma independiente al menos tres veces. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

<sup>a</sup> Datos tomados de Alvarez *et al.* (2009).

#### 4.1.2. Fidelidad de síntesis de DNA determinada a partir de los parámetros cinéticos obtenidos en condiciones de estado pre-estacionario

##### 4.1.2.1. Discriminación entre dNTPs correctos e incorrectos.

En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P para medir los parámetros cinéticos de incorporación de los nucleótidos incorrectos (dCTP, dGTP o dATP) en el extremo 3' del iniciador. Los resultados de estos ensayos, comparados con los obtenidos para la incorporación del nucleótido correcto (dTTP) sobre el mismo complejo, se muestran en la **Tabla 10**.

Las eficiencias de incorporación ( $f_{inc}$ ) obtenidas para los nucleótidos incorrectos dCTP y dGTP, y para las cuatro enzimas analizadas, se encuentran en un rango comprendido entre  $1,42 \times 10^{-6}$  y  $9,73 \times 10^{-5}$ . En general, estos valores fueron algo mayores para las RTs del VIH-1 (O\_WT y BH10\_WT).

Las mayores diferencias entre las RTs de los dos géneros estudiados se obtuvieron en las estimaciones de  $k_{pol}$ , que para la incorporación de algunos nucleótidos fue 100 veces más baja en reacciones catalizadas por RTs de *Gammaretrovirus*.

A pesar de que el efecto es menos pronunciado cuando lo que se compara son las eficiencias de incorporación de nucleótidos erróneos, se mantiene que la RT del MLV es más fiel que la RT BH10\_WT y también que la RT O\_WT, aunque en este caso las diferencias con la RT del MLV son pequeñas en el caso de la incorporación de dGTP.

**Tabla 10. Parámetros cinéticos de la incorporación de nucleótidos correcto e incorrectos en condiciones de estado pre-estacionario.**

Enzima	Nucleótido	$k_{pol} (s^{-1})$	$K_d (\mu M)$	$k_{pol}/K_d (\mu M^{-1} \cdot s^{-1})$	$f_{inc}^a$
<b>XMRV</b>	dTTP	$0,19 \pm 0,02$	$24,1 \pm 4,3$	$(7,83 \pm 1,71) \times 10^{-3}$	
	dCTP	$(2,34 \pm 0,24) \times 10^{-3}$	$3800 \pm 1181$	$(6,17 \pm 2,02) \times 10^{-7}$	$7,88 \times 10^{-5}$ <b>(0,56)</b>
	dGTP	$(8,61 \pm 0,97) \times 10^{-5}$	$2433 \pm 199$	$(3,54 \pm 0,49) \times 10^{-8}$	$4,52 \times 10^{-6}$ <b>(21,5)</b>
	dATP	$(4,16 \pm 0,17) \times 10^{-4}$	$2914 \pm 832$	$(1,42 \pm 0,41) \times 10^{-7}$	$1,81 \times 10^{-5}$ <b>(0,27)</b>
<b>MLV</b>	dTTP	$1,55 \pm 0,17$	$24,9 \pm 7,1$	$(6,21 \pm 1,88) \times 10^{-2}$	
	dCTP	$(2,08 \pm 0,26) \times 10^{-3}$	$1466 \pm 789$	$(1,42 \pm 0,78) \times 10^{-6}$	$2,29 \times 10^{-5}$ <b>(1,9)</b>
	dGTP	$(8,30 \pm 0,83) \times 10^{-4}$	$1135 \pm 325$	$(7,33 \pm 2,22) \times 10^{-7}$	$1,18 \times 10^{-5}$ <b>(8,2)</b>
	dATP	$(4,39 \pm 0,69) \times 10^{-4}$	$4960 \pm 2842$	$(8,87 \pm 5,27) \times 10^{-8}$	$1,42 \times 10^{-6}$ <b>(3,5)</b>
<b>O_WT<sup>b</sup></b>	dTTP	$14,7 \pm 1,0$	$11,8 \pm 2,9$	$1,25 \pm 0,32$	
	dCTP	$0,724 \pm 0,104$	$7652 \pm 2083$	$(9,46 \pm 2,91) \times 10^{-5}$	$7,57 \times 10^{-5}$ <b>(0,58)</b>
	dGTP	$0,151 \pm 0,027$	$11730 \pm 3750$	$(1,29 \pm 0,47) \times 10^{-5}$	$1,03 \times 10^{-5}$ <b>(9,5)</b>
	dATP	$0,0073 \pm 0,0002$	$1485 \pm 150$	$(4,92 \pm 2,17) \times 10^{-6}$	$3,94 \times 10^{-6}$ <b>(1,3)</b>
<b>BH10_WT<sup>b</sup></b>	dTTP	$11,6 \pm 0,5$	$13,4 \pm 1,9$	$0,863 \pm 0,126$	
	dCTP	$0,291 \pm 0,052$	$7645 \pm 2959$	$(3,80 \pm 1,62) \times 10^{-5}$	$4,40 \times 10^{-5}$
	dGTP	$0,289 \pm 0,032$	$3535 \pm 1099$	$(8,40 \pm 2,84) \times 10^{-5}$	$9,73 \times 10^{-5}$
	dATP	$(2,40 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$559 \pm 191$	$(4,29 \pm 1,50) \times 10^{-6}$	$4,99 \times 10^{-6}$

Se usó el complejo 31T/21P. Los datos se muestran como el valor medio  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se realizó al menos tres veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

<sup>a</sup> Eficiencia de incorporación errónea:  $f_{inc} = [k_{pol}(\text{incorrecto})/K_d(\text{incorrecto}) / k_{pol}(\text{correcto})/K_d(\text{correcto})]$ , donde los nucleótidos incorrectos fueron dCTP, dGTP y dATP. Entre paréntesis se indica el incremento de fidelidad respecto a la enzima BH10\_WT. Estos valores se obtuvieron dividiendo los datos de  $f_{inc}$  de BH10\_WT entre los valores de las  $f_{inc}$  de las demás enzimas.

<sup>b</sup> Datos tomados de Alvarez *et al.* (2009).

Las eficiencias de incorporación incorrecta de G frente a A en ensayos catalizados por la RT del XMRV fueron más bajas que las obtenidas con las enzimas del VIH-1. Sin embargo, las diferencias fueron muy pequeñas para las otras dos incorporaciones erróneas (C ó A frente a A). En el contexto de secuencia estudiado, se observa que la RT del XMRV parece ser menos fiel que la del MLV en incorporaciones de C ó A en lugar de T, pero más fiel en la incorporación de G en lugar de T.

#### 4.1.2.2. Extensión de complejos molde-iniciador con extremos desapareados

Con el fin de analizar la capacidad de las enzimas de extender un error introducido en la cadena de DNA se realizaron cinéticas de extensión de extremos desapareados en condiciones de estado pre-estacionario.

Así, se analizó la incorporación de un nucleótido correcto (dTTP) utilizando tres complejos molde-iniciador con extremos 3' desapareados (G:T, G:G y G:A), para lo que

se emplearon los complejos descritos en la **Tabla 7** (31T/21PT, 31T/21PG y 31T/21PA). Las constantes de velocidad ( $k_{\text{obs}}$ ) se determinaron bajo condiciones de “single-turnover”, usando un exceso de enzima (120 nM) sobre sustrato (100 mM) y midiendo la cantidad de producto formado a distintas concentraciones de dTTP. La representación de la  $k_{\text{obs}}$  frente a la concentración de dTTP, se ajustó a una hipérbola. Así, se obtuvieron los parámetros cinéticos ( $k_{\text{pol}}$ ,  $K_d$ ) para las RTs estudiadas (**Tabla 11**).

**Tabla 11. Parámetros cinéticos de extensión de extremos desapareados en condiciones de estado pre-estacionario.**

Enzima	Par de bases en posición 3', <sup>a</sup>	$k_{\text{pol}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_d$ (μM)	$k_{\text{pol}}/K_d$ (μM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$f_{\text{ext}}$ <sup>b</sup>
<b>XMRV</b>	G:C	0,19 ± 0,02	24,1 ± 4,3	$(7,83 \pm 1,71) \times 10^{-3}$	
	G:T	$(4,99 \pm 0,26) \times 10^{-2}$	3012 ± 418	$(1,66 \pm 0,25) \times 10^{-5}$	$2,12 \times 10^{-3}$ <b>(0,53)</b>
	G:G	$(3,35 \pm 0,30) \times 10^{-3}$	3084 ± 714	$(1,09 \pm 0,27) \times 10^{-6}$	$1,39 \times 10^{-4}$ <b>(2,19)</b>
	G:A	$(4,27 \pm 0,21) \times 10^{-4}$	3058 ± 557	$(1,39 \pm 0,26) \times 10^{-7}$	$1,78 \times 10^{-5}$ <b>(0,20)</b>
<b>MLV</b>	G:C	1,55 ± 0,17	24,9 ± 7,1	$(6,21 \pm 1,88) \times 10^{-2}$	
	G:T	$(6,41 \pm 0,38) \times 10^{-2}$	4378 ± 502	$(1,46 \pm 0,19) \times 10^{-5}$	$2,35 \times 10^{-4}$ <b>(4,76)</b>
	G:G	$(4,84 \pm 0,60) \times 10^{-3}$	4535 ± 1291	$(1,07 \pm 0,33) \times 10^{-6}$	$1,72 \times 10^{-5}$ <b>(17,73)</b>
	G:A	$(8,21 \pm 0,56) \times 10^{-4}$	2816 ± 454	$(2,92 \pm 0,51) \times 10^{-7}$	$4,70 \times 10^{-6}$ <b>(0,76)</b>
<b>O_WT<sup>c</sup></b>	G:C	14,7 ± 1,0	11,8 ± 2,9	1,25 ± 0,32	
	G:T	7,6 ± 0,9	2638 ± 785	$(2,88 \pm 0,92) \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-3}$ <b>(0,48)</b>
	G:G	0,559 ± 0,071	1132 ± 316	$(4,94 \pm 1,51) \times 10^{-4}$	$4,01 \times 10^{-4}$ <b>(0,76)</b>
	G:A	0,021 ± 0,003	7817 ± 2334	$(2,71 \pm 0,89) \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^{-6}$ <b>(1,66)</b>
<b>BH10_WT<sup>c</sup></b>	G:C	11,6 ± 0,5	13,4 ± 1,9	0,863 ± 0,126	
	G:T	2,54 ± 0,13	2628 ± 252	$(9,66 \pm 1,04) \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-3}$
	G:G	0,266 ± 0,020	1014 ± 188	$(2,62 \pm 0,52) \times 10^{-4}$	$3,05 \times 10^{-4}$
	G:A	0,0158 ± 0,0009	5110 ± 755	$(3,09 \pm 0,49) \times 10^{-6}$	$3,59 \times 10^{-6}$

Se usaron los complejos 31T/21P, 31T/21PT, 31T/21PG y 31T/21PA. Los datos se muestran como el valor medio ± desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se realizó al menos tres veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

<sup>a</sup> La primera base corresponde al molde y la segunda al iniciador.

<sup>b</sup> Eficiencia de extensión de extremos desapareados viene dada por la expresión:

$f_{\text{ext}} = [k_{\text{pol}}(\text{desapareado})/K_d(\text{desapareado}) / k_{\text{pol}}(\text{apareado})/K_d(\text{apareado})]$ . Entre paréntesis se indica el incremento de fidelidad respecto a la enzima BH10\_WT. Estos valores se obtuvieron dividiendo los datos de  $f_{\text{ext}}$  de BH10\_WT entre los valores de las  $f_{\text{ext}}$  de las demás enzimas.

<sup>c</sup> Datos tomados de Alvarez *et al.* (2009).

Todas las RTs presentaron mayor eficiencia de extensión para el extremo G:T que para los extremos G:G y G:A. Los valores de la eficiencia de extensión para el extremo G:T se obtuvieron en el rango de  $2,35 \times 10^{-4}$  a  $2,30 \times 10^{-3}$ , siendo de nuevo la RT del

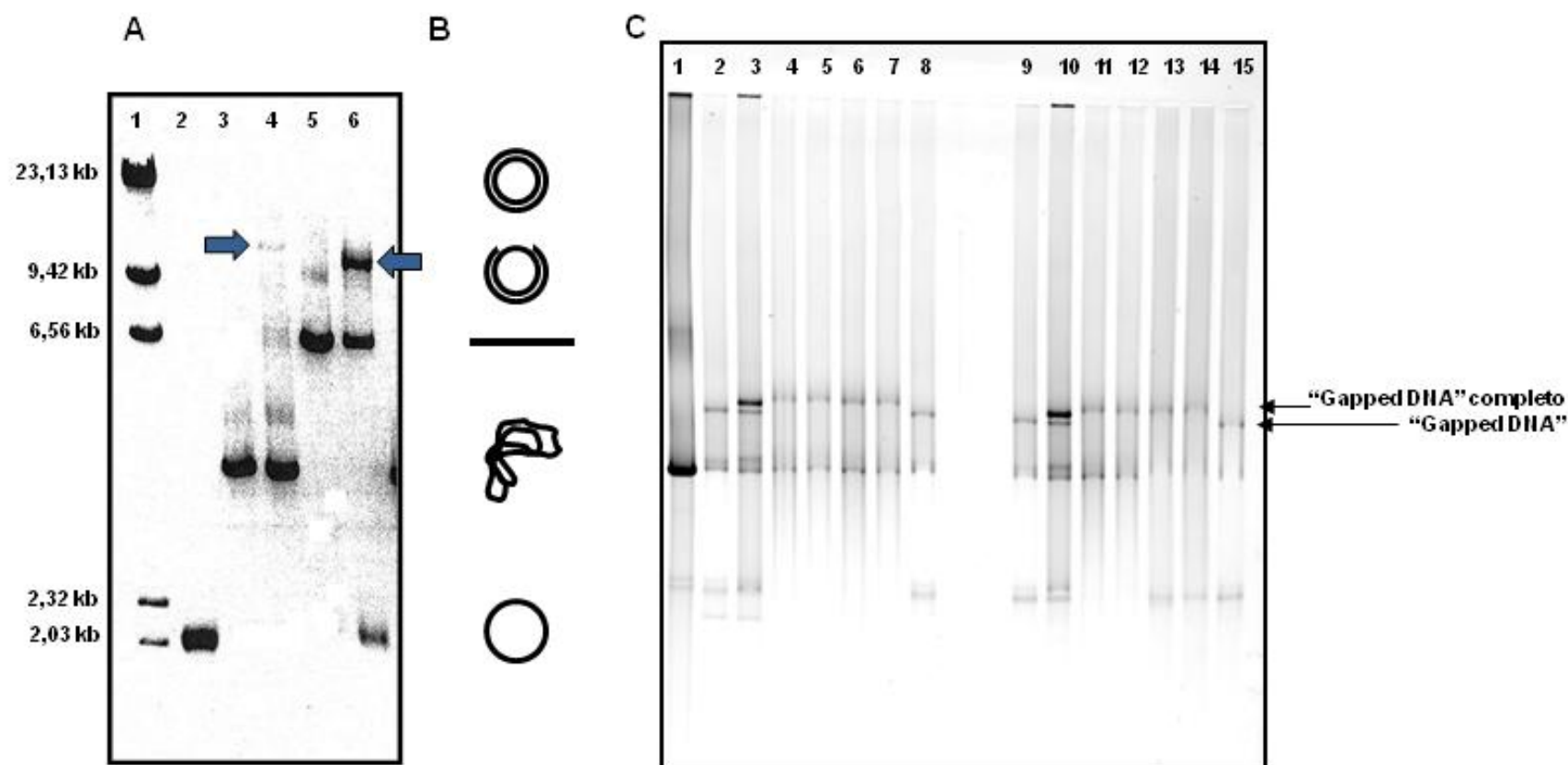
MLV la que mostró las eficiencias más bajas y con ello la fidelidad más alta. El aumento de fidelidad de la RT del MLV en los ensayos de extensión de extremos desapareados también se observa en la extensión del extremo desapareado G:G. El valor de la eficiencia de extensión fue en este caso de  $1,72 \times 10^{-5}$ , considerablemente menor a los obtenidos para las RTs del XMRV, BH10\_WT y O\_WT, cuyos valores varían en un rango de  $1,39 \times 10^{-4}$  a  $4,01 \times 10^{-4}$ . La extensión del extremo G:A es ineficiente para todas las enzimas analizadas, obteniéndose valores de eficiencia de  $2,17 \times 10^{-6}$  a  $1,78 \times 10^{-5}$ .

#### **4.1.3. Determinación de la fidelidad de copia dependiente de molde DNA mediante ensayos genéticos de introducción de mutaciones**

Para confirmar los resultados obtenidos en los ensayos bioquímicos y además poder obtener la tasa global de mutación de las RTs de los cuatro retrovirus estudiados, se utilizó un ensayo genético basado en la introducción de mutaciones por la RT usando como molde el DNA del fago M13mp2 y el gen *lacZα* como marcador. Las mutaciones generadas cuando la RT copia la secuencia del gen *lacZα* eliminada de una de las cadenas del DNA del M13mp2, pueden ser identificadas tras detectarse como mutantes, placas de lisis con fenotipo de color azul claro o incoloro, debido a la inactivación de la actividad β-galactosidasa.

Los sustratos utilizados en el ensayo genético se obtienen de una infección de la cepa de *E. coli* NR9099 con el fago M13mp2. A partir del sobrenadante obtenemos el ssDNA, ya que es ahí donde se encuentra el fago en su forma libre. Del precipitado bacteriano es de donde obtenemos la forma replicativa o dsDNA. El “gapped DNA” fue sintetizado eliminando un fragmento de la secuencia que codifica para el gen *lacZα* de una de las cadenas del dsDNA. La **Figura 20A** muestra los tamaños de los distintos sustratos utilizados en el ensayo. Diferenciamos la cadena sencilla y el fragmento de 6876 pb de DNA de doble cadena, sustratos utilizados para obtener el “gapped DNA”, al que le faltan 407 nucleótidos de una de sus cadenas, incluyendo en esta delección la secuencia que codifica para el gen *lacZ*.





**Figura 20. Relación de tamaños de los distintos sustratos utilizados en los ensayos genéticos en geles de agarosa al 0,8%. (A)** Gel con los sustratos utilizados en el ensayo genético. 1. Fragmentos del DNA del fago  $\lambda$  digerido con HindIII; 2. ssDNA del fago M13mp2; 3. dsDNA del fago M13mp2 (RF); 4. dsDNA forma relajada del fago M13mp2 (RFII); 5. Fragmento linearizado del dsDNA del fago M13mp2 de 6789 pb; 6. "Gapped DNA". La flecha de la izquierda indica la banda que corresponde a la RFII, y la flecha de la derecha indica la banda correspondiente al "gapped DNA". **(B)** Representación gráfica de los distintos sustratos según su peso molecular, de mayor a menor: dsDNA forma relajada del fago M13mp2 (RFII), "Gapped DNA", fragmento linearizado del dsDNA del fago M13mp2 de 6789 pb, dsDNA del fago M13mp2 (RF) y ssDNA del fago M13mp2. **(C)** Ejemplo de la comprobación de la reacción de síntesis. 1. Fragmento dsDNA de 6789 pb; 2. "Gapped DNA"; 3. "Gapped DNA" y RFII; 4-7. Reacción de síntesis de la RT del XMRV; 8-9. "Gapped DNA"; 10. "Gapped DNA" y RFII; 11-14. Reacción de síntesis de la RT del MLV. 15. "Gapped DNA". Las flechas indican la altura a la que corren las muestras de "gapped DNA" sin rellenar y el que ya se ha completado por la RT tras la reacción de síntesis.

La **Figura 20C** muestra la comparación del tamaño del “gapped DNA” con el producto de reacción tras la polimerización realizada por la RT, que da como resultado un “gapped DNA” relleno, cuyo tamaño se compara con la forma relajada circular del DNA de doble cadena del fago M13mp2.

Tras electroporar el producto de la reacción de síntesis en células competentes y un posterior plaqueo en presencia de X-Gal e IPTG, se detectan las placas de lisis. Un césped bacteriano de la cepa de *E. coli* CSH50 permite la  $\alpha$ -complementación necesaria para detectar la actividad del gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa.

La frecuencia de mutantes se calculó tras el recuento total de las placas y su posterior confirmación mediante secuenciación del DNA de los fagos mutantes. Dicha frecuencia se define como la relación entre el número de placas mutantes y el número de placas totales obtenidas en el ensayo.

En la bibliografía encontramos referencias a la existencia de un fondo o “background” en la determinación de la tasa de mutantes en este tipo de ensayos. Este fondo podría asignarse a recombinación del DNA del M13mp2 que puede resultar en la pérdida del gen *lacZ*. La frecuencia de mutantes correspondiente al fondo se estima en torno a  $6 \times 10^{-4}$  (Bebenek y Kunkel, 1995; Matamoros *et al.*, 2008). Con el objetivo de conseguir estimar el valor de un fondo debido a los errores introducidos en la secuencia del *lacZ* $\alpha$  por las polimerasas de *E. coli* al sintetizar el DNA en el proceso de replicación, se realizó un experimento control. Para ello se transformó el “gapped DNA” en bacterias competentes *E. coli* MC1061. Este experimento se realizó de forma paralela al análisis de nuestras enzimas, para asegurar las mismas condiciones en todos los ensayos. De este experimento esperábamos poder determinar los posibles mutantes debidos a la incorporación de errores en la secuencia del gen marcador por las polimerasas de *E. coli*. Tras un análisis de 2-3 electroporados se obtuvieron un total de 22189 placas con un fenotipo “wild-type” (sin mutaciones), lo que se tradujo en una frecuencia de mutantes inferior a  $4,5 \times 10^{-5}$ .

Con estos ensayos basados en la expresión del gen *lacZ* se analizó la fidelidad de una RT del MLV disponible comercialmente (suministrada por Promega), además de la enzima purificada. Los datos obtenidos para la misma RT procedente de distintas fuentes fueron similares y muestran que la RT del MLV es alrededor de 15 veces más fiel que la enzima de BH10\_WT del VIH-1 (**Tabla 12**). La RT O\_WT resultó ser al menos 2,5 veces más fiel que la RT del VIH-1 cepa BH10 y por tanto mostró diferencias de fidelidad

menores en su comparación con la enzima del MLV. Por su parte la RT del XMRV muestra una frecuencia de mutantes del 0,157%, muy similar a la obtenida con las dos RTs del MLV.

**Tabla 12. Fidelidad de las RTs determinada mediante ensayos genéticos.**

Enzima	Nº total de placas	Nº total de placas mutantes	Frecuencia de mutantes <sup>a</sup>
<b>XMRV</b>	52196	82	0,00157 <b>(13,1)</b>
<b>MLV<sup>b</sup></b>	29648	40	0,00142 <b>(14,5)</b>
<b>MLV<sup>c</sup></b>	52207	70	0,00134 <b>(15,4)</b>
<b>O_WT</b>			
<b>Experimento 1<sup>d</sup></b>	7579	63	0,00831 <b>(2,5)</b>
<b>Experimento 2</b>	8698	63	0,00724 <b>(2,8)</b>
<b>Experimento 3</b>	5063	40	0,00790 <b>(2,6)</b>
<b>BH10_WT<sup>d</sup></b>	6736	139	0,02063

Datos obtenidos como resultado del análisis de 4-6 reacciones diferentes de síntesis de rellenado del “gapped DNA” realizadas para cada enzima. Considerándose un fondo o “background” inferior a  $4,5 \times 10^{-5}$ .

<sup>a</sup> Los números entre paréntesis indican el incremento de fidelidad relativo a la RT de BH10.

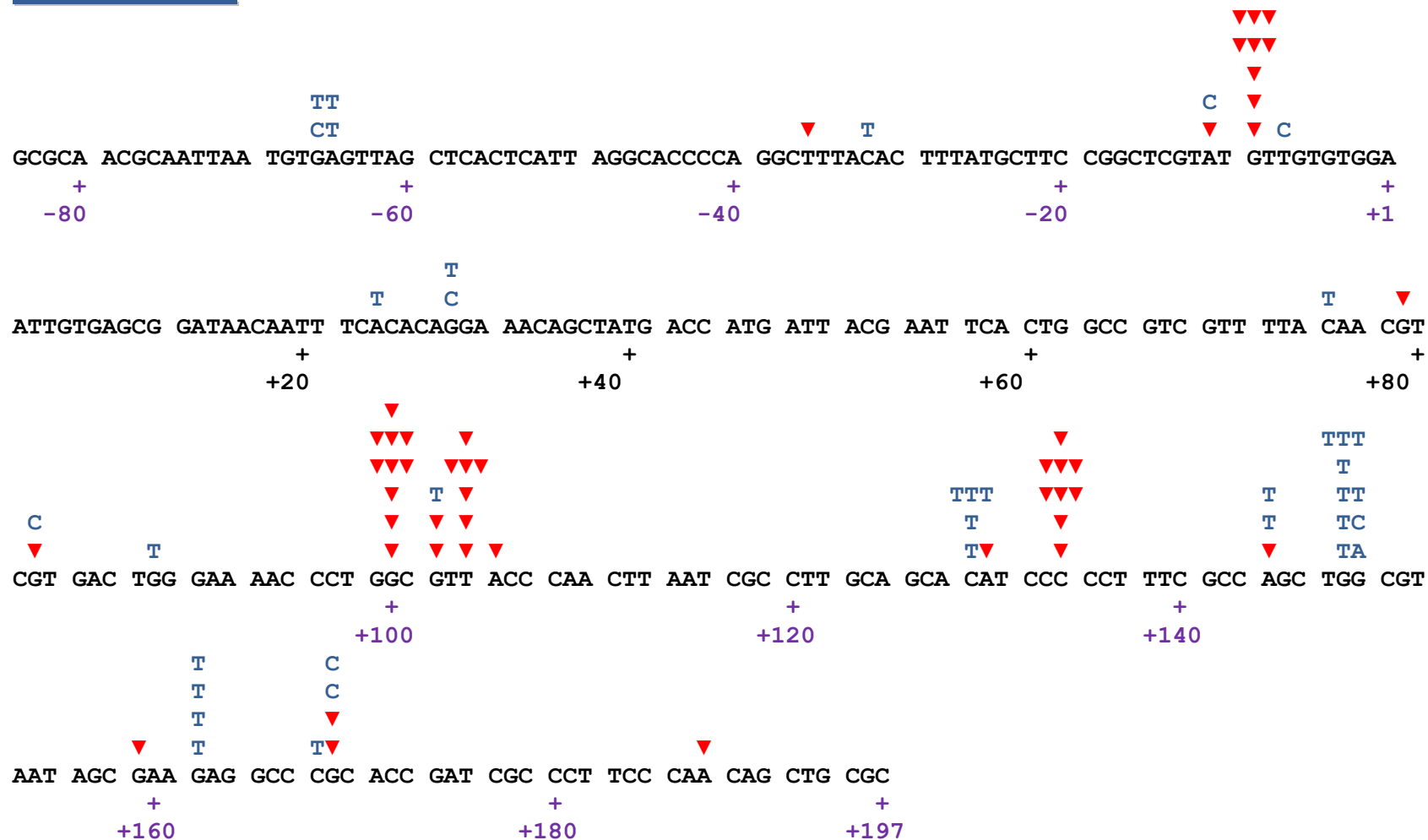
<sup>b</sup> RT del MLV suministrada por Promega Corp (nº de catálogo: M1701).

<sup>c</sup> RT del MLV expresada y purificada en el laboratorio usando el plásmido pMuLVRT.

<sup>d</sup> Datos tomados de Alvarez *et al.* (2009).

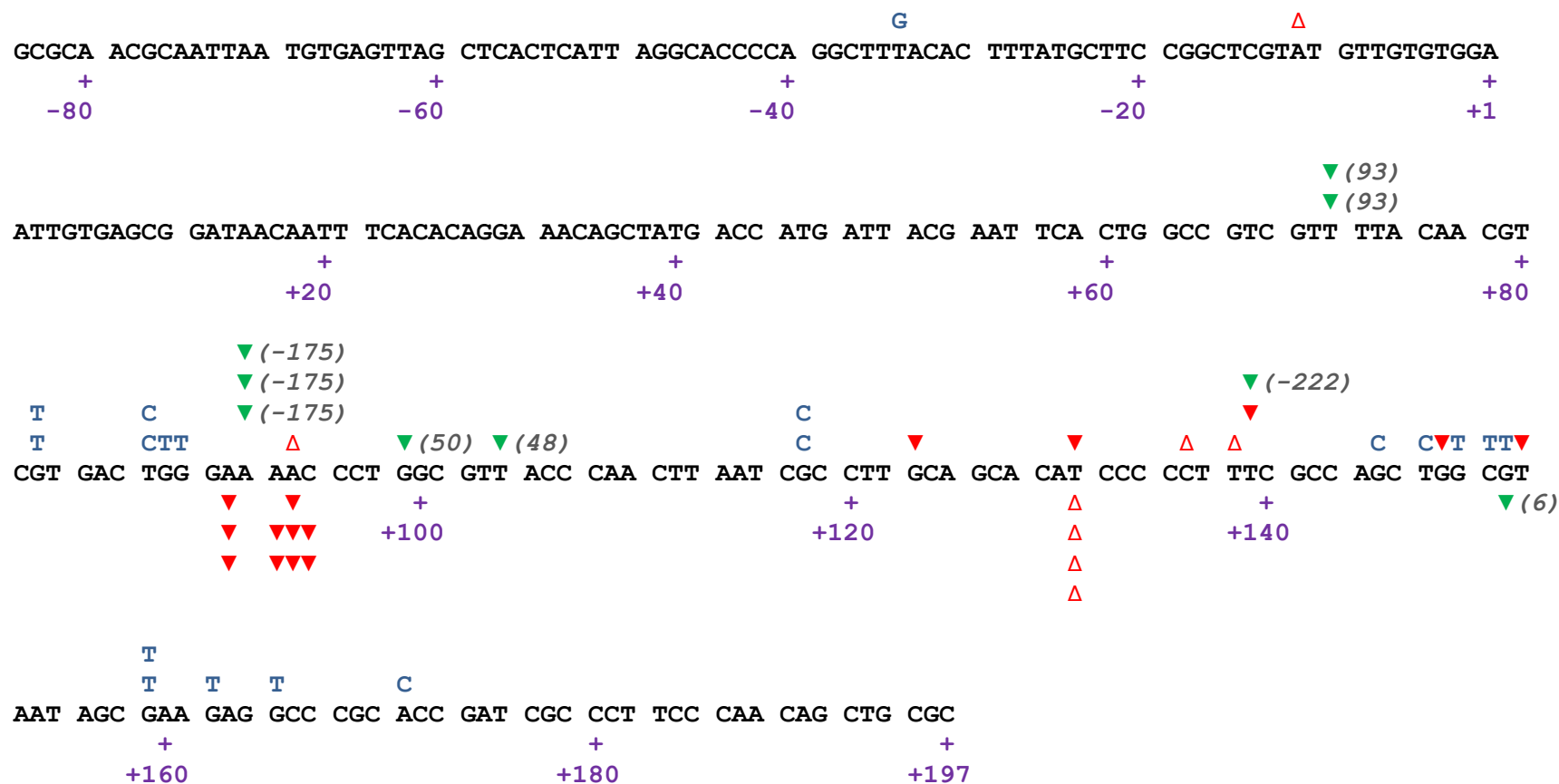
La especificidad mutacional de las enzimas fue determinada mediante secuenciación del gen *lacZ* de los mutantes generados en el ensayo (**Figuras 21-24**). El espectro de mutaciones obtenido con la RT del XMRV revela una acumulación de errores en seis posiciones de la secuencia del *lacZ* (“hot-spots”): -9, +100, +104, +129, +134 y +148. Cuatro de estas posiciones se caracterizan por presentar una alta frecuencia de deleciones de un único nucleótido (-9, +100, +104 y +134), mientras que en las otras dos predominan los cambios C→T y G→T. Solo uno de los “hot-spots” se da en una zona homopolimérica (secuencia rica en citosina alrededor de la posición +134), sugiriendo que el mecanismo de introducción de errores por la enzima no se debe mayoritariamente a un deslizamiento de ésta en el molde. La distribución de errores obtenida para la RT del XMRV difiere de los mapas de mutaciones obtenidos con las RTs las enzimas del VIH-1 o del MLV. En la **Tabla 13** se muestra un resumen de las frecuencias de las distintas clases de errores cometidos por las RTs estudiadas.

## RT del XMRV

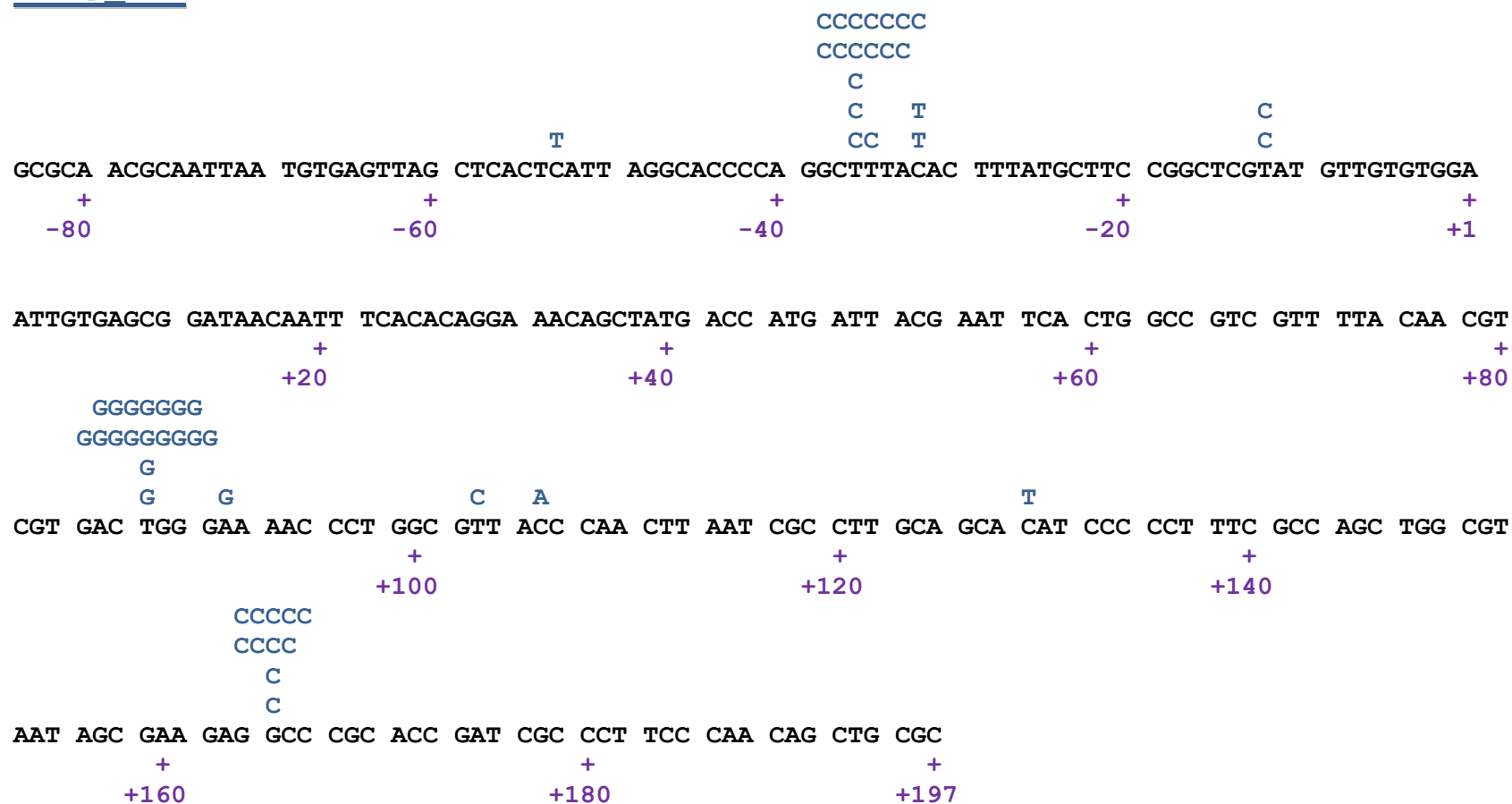


**Figura 21. Espectro de mutaciones inducidas por la RT del XMRV durante la síntesis de DNA dependiente de molde DNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo ( $\Delta$ ) y las delecciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido ( $\nabla$ ).

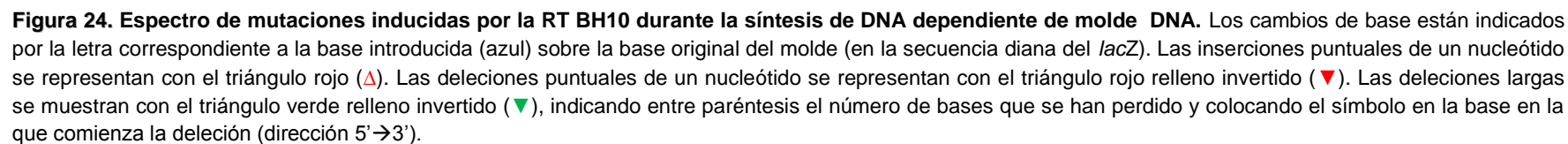
## RT del MLV



**Figura 22. Espectro de mutaciones inducidas por la RT del MLV durante la síntesis de DNA dependiente de molde DNA.** Se presentan los datos de un ensayo representativo de los realizados con las dos enzimas del MLV. Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo (Δ). Las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido (▼). Las deleciones largas se muestran con el triángulo verde relleno invertido (▼), indicando entre paréntesis el número de bases que se han perdido. Cuando el número indicado entre paréntesis es negativo indica que la base sobre la que está el triángulo es el nucleótido en el que comienza la deleción (dirección 5'→3'), en el caso de los números negativos lo que indican es que la base sobre la que está el triángulo es el último nucleótido que engloba la deleción (dirección 3'→5').

RT O\_WT

**Figura 23. Espectro de mutaciones inducidas por la RT O\_WT durante la síntesis de DNA dependiente de molde DNA.** Se representan los datos de un ensayo representativo. Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*).



**Tabla 13. Resumen de las tasas de error para cada RT en función de la clase de mutación introducida.**

Errores	XMRV		MLV		BH10_WT <sup>a</sup>		O_WT <sup>a</sup>	
	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error
<b>Todos</b>	86	1/86305	49	1/86040	49	1/7369	49	1/17166
<b>Cambios de base</b>	38	1/103018	19	1/117032	31	1/5760	49	1/9053
Transiciones	10 (26.3%)		3 (15.8%)		20 (64.5%)		25 (51%)	
Transversiones	28 (73.7%)		16 (84.2%)		11 (35.5%)		24 (49%)	
<b>Cambios en el marco de lectura</b>	48	1/96563	30	1/87758	18	1/11745	0	<1/541516
Inserciones	0 (0%)		8 (26.7%)		3 (16.7%)		0	
Deleciones	48 (100%)		22 (73.3%)		15 (83.3%)		0	

El cálculo de la tasa de error se realizó multiplicando la frecuencia de mutaciones totales por el porcentaje que representa una determinada clase de cambios (por ejemplo, cambios de base). El número obtenido se divide entre 0,6 (probabilidad de la expresión de una nueva hebra sintetizada por *E. coli*) y entre el número total de sitios en los que dicha clase de cambios produciría un cambio fenotípico. Los números entre paréntesis muestran el porcentaje que representan las transiciones y las transversiones respecto al total de errores por cambio de base; del mismo modo se indican los porcentajes relativos a inserciones y deleciones respecto al número total de errores que producen cambios en el marco de lectura.

<sup>a</sup> Datos tomados del Alvarez *et al.* (2009).

Al igual que sucede con la RT del MLV, la enzima del XMRV tiene una tendencia elevada a introducir mutaciones que producen cambios en el marco de lectura. Este tipo de mutaciones representa un 60% de todos los errores generados por las dos enzimas. Sin embargo, este tipo de cambios se ve reducido en el espectro producido por la RT BH10\_WT del VIH-1, que pasa a ser un 36,7%; y en el caso de la RT del O\_WT no los produce, o los produce con muy baja frecuencia.

Si se comparan las frecuencias de error, la RT del XMRV muestra una frecuencia 17,9 veces más baja que la RT BH10\_WT en cuanto a las mutaciones consistentes en cambios de base y 8,2 veces menor en cambios en el marco de lectura. Los valores obtenidos con la RT del XMRV fueron similares a los obtenidos con la RT del MLV. Ambos *Gammaretrovirus* muestran una tendencia mayor a producir transversiones que las RTs del VIH-1. Los cambios en el marco de lectura producidos por la RT del VIH-1 clon BH10 se acumulan fundamentalmente en regiones con secuencias homopoliméricas.



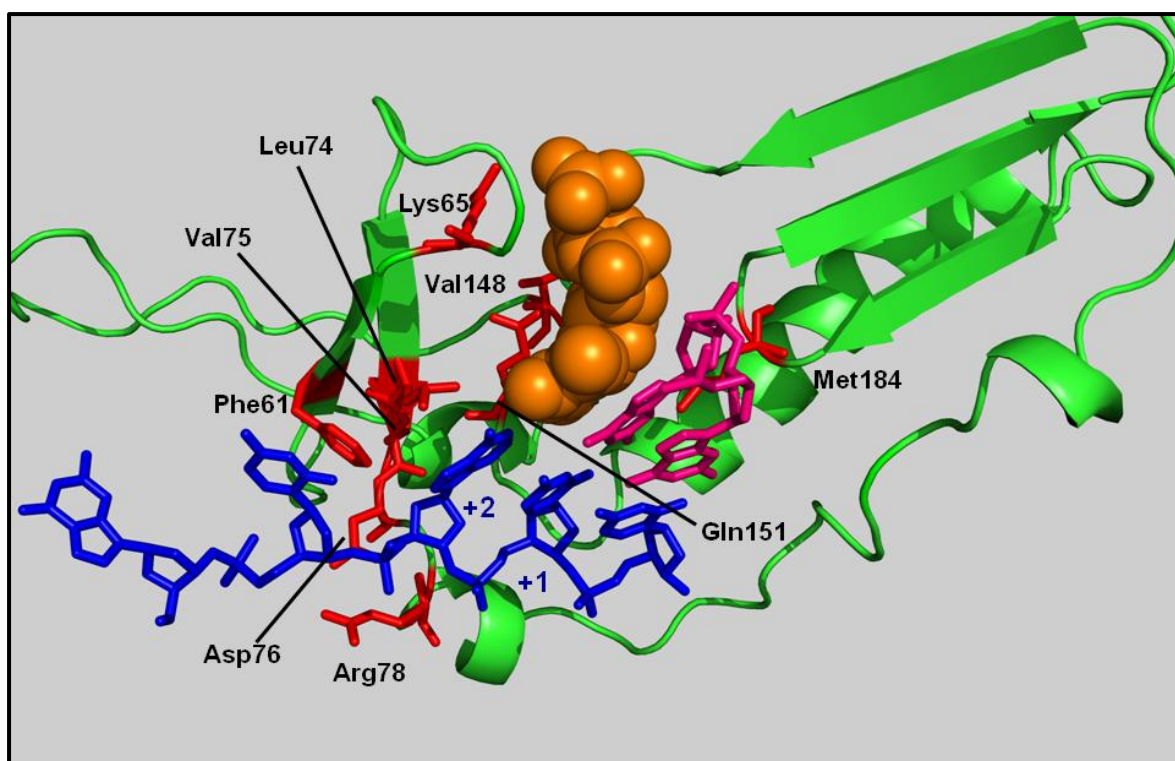
También se observa que las inserciones y deleciones producidas por la RT del MLV se localizan a lo largo de la secuencia tanto en regiones homopoliméricas como heteropoliméricas. Sin embargo, en el caso del XMRV, la aparición de estas mutaciones es mayor en las regiones heteropoliméricas. En el espectro generado por la RT del XMRV, las deleciones de un nucleótido se dan en zonas homopoliméricas de la secuencia molde con una frecuencia de 1/247400. Este valor es 2,5 veces inferior al obtenido para esos mismos tipos de errores en el espectro de la RT del MLV. Otras diferencias entre las RTs del XMRV y del MLV son las referidas a la distribución de inserciones y deleciones. Más de un 30% de los errores encontrados en el espectro de mutaciones de la RT del MLV son deleciones largas, o inserciones de un único nucleótido. Sin embargo, estos tipos de cambio no se observan en el ensayo realizado con la RT del XMRV.

#### **4.2. Selección de cambios de aminoácido que introducidos en el contexto de secuencia de la RT del VIH-1 de grupo O podrían mejorar su fidelidad de copia**

En ensayos anteriormente publicados por nuestro grupo (Álvarez *et al.*, 2009) se demostró que una RT del VIH-1 de grupo O mostraba una mayor estabilidad a temperaturas elevadas que las RTs de *Gammaretrovirus* y que la RT característica del VIH-1 grupo M subtipo B (BH10\_WT). Además, se describió que la fidelidad de la enzima de grupo O era superior a la de la RT del VIH-1 (aislado BH10), por lo que intentamos mejorar aún más su fidelidad introduciendo cambios en su secuencia que provocasen un aumento en la fidelidad de copia de la enzima sin afectar a su estabilidad o a su eficacia catalítica.

A partir de una amplia revisión bibliográfica seleccionamos sustituciones realizadas en la RT del VIH-1 grupo M subtipo B que daban lugar a RTs con una fidelidad incrementada. Algunos ejemplos de estas mutaciones fueron F61A (Fisher *et al.*, 2002), K65R (Shah *et al.*, 2000), L74V (Rubinek *et al.*, 1997; Jonckheere *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2000), V75I (Matamoros *et al.*, 2008), D76V (Kim *et al.*, 1998), R78A (Kim *et al.*, 1999), V148I (Weiss *et al.*, 2004), Q151N (Weiss *et al.*, 2000, 2002) y M184I (Hsu *et al.*, 1997; Oude Essink *et al.*, 1997; Rezende *et al.*, 1998; Jonckheere *et al.*, 2000). Muchos de los residuos implicados en estas sustituciones juegan un papel importante en la incorporación del dNTP, estabilizando tanto al nucleótido entrante como al complejo molde-iniciador. Así, la cadena lateral de Phe61 interacciona con las posiciones +2 y +3 del molde mostrando una gran superficie de contacto con dicha cadena. Los residuos de

las posiciones 74-78 interaccionan con el nucleótido +1 del molde, siendo Leu74 y Arg78 los aminoácidos que muestran el mayor número de interacciones. Lys65, Val148 y Gln151 interaccionan con el dNTP entrante. Met184 contacta con la cadena del iniciador en su extremo 3' (Figura 25).



**Figura 25. Representación de los aminoácidos de la RT del VIH-1 localizados en la zona de incorporación del dNTP entrante.** Las cadenas laterales de los aminoácidos implicados aparecen en rojo. Se presenta en naranja el dNTP entrante. En color azul se muestra la cadena del molde DNA, indicando con la numeración en azul sus posiciones +1 y +2, y en color magenta se muestra la cadena del iniciador. La estructura ha sido obtenida del Protein Data Bank (código 1RTD) (Huang *et al.*, 1998). Se ha realizado la figura utilizando el programa PyMOL.

A la hora de elegir los cambios a introducir en la RT del VIH-1 de grupo O, nos basamos en la información disponible en la bibliografía sobre sus efectos en fidelidad, estabilidad y procesividad; casi siempre determinadas con variantes de la RT del VIH-1 grupo M subtipo B. Todos los cambios mencionados (F61A, K65R, L74V, V75I, D76V, R78A, V148I, Q151N y M184I) producen un considerable incremento en la fidelidad de copia de la enzima, mostrando un descenso de entre 2 y 11 veces en la frecuencia de mutantes producidos por la enzima “wild type” de grupo M subtipo B en ensayos genéticos basados en la expresión del gen *lacZ* del fago M13mp2. Para conseguir

enzimas con una fidelidad comparable a la que muestra la RT del MLV, deberíamos conseguir un aumento de fidelidad de unas 6 veces sobre la calculada para la RT del VIH-1 grupo O. Por tanto, se seleccionaron los cambios de aminoácido que producían el mayor incremento de fidelidad en el contexto de secuencia de la RT del VIH-1 grupo M subtipo B. Los cambios de Phe61, Lys65, Lys74, Arg78 y Val148 por Ala, Arg, Val, Ala e Ile, respectivamente, fueron los elegidos. Sin embargo, la procesividad descrita para los mutantes F61A y L74V es mucho menor que la que caracteriza a la enzima WT (Silverman *et al.*, 2008; Alak *et al.*, 2010), y en el caso del mutante V148I su afinidad por el dNTP disminuye de manera considerable respecto a la afinidad exhibida por la RT no mutada (Operario *et al.*, 2006). Por ello se descartaron estos cambios que en principio podían producir un efecto negativo sobre la eficacia catalítica de polimerización de la enzima “wild type” y se seleccionaron los cambios K65R y R78A.

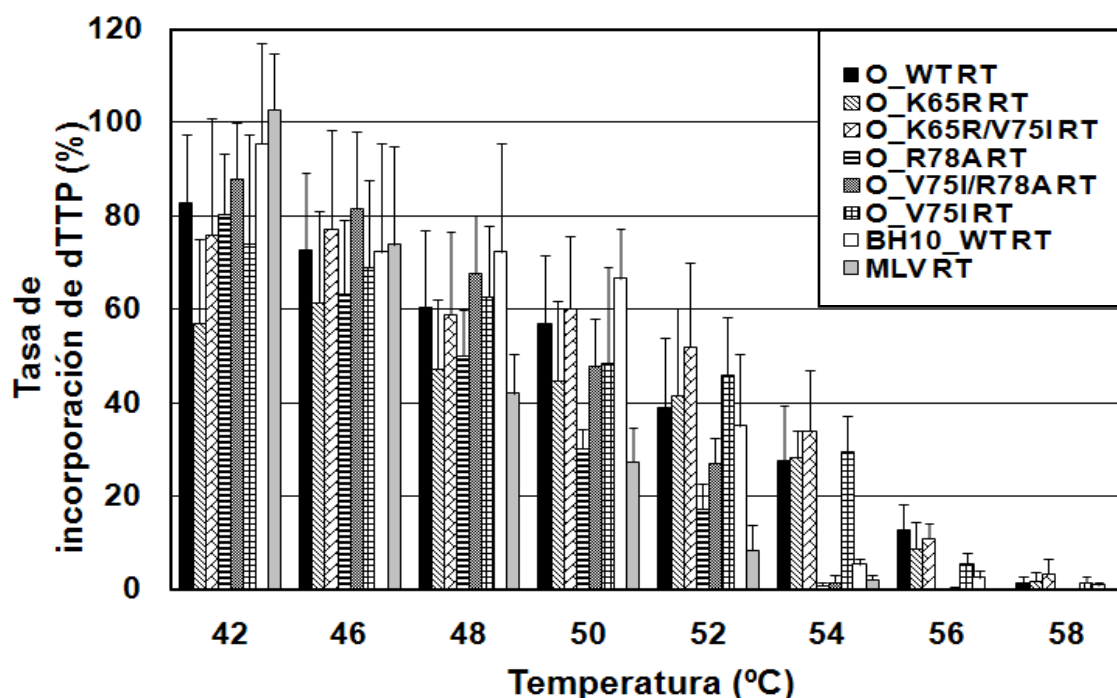
En estudios previos realizados en el laboratorio, se había caracterizado también una RT del VIH-1 de grupo O portadora del cambio V75I (Álvarez *et al.*, 2009). Se observó que esta mutación constante en la sustitución de Val75 por Ile producía el mismo efecto sobre fidelidad en el contexto de secuencia del grupo O, que el descrito con anterioridad en la RT del VIH-1 grupo M subtipo B (Matamoros *et al.*, 2008), incrementándose entre 1,5 y 2 veces la fidelidad de las enzimas. Con estos datos diseñamos los mutantes sencillos O\_K65R y O\_R78A, y dos mutantes dobles O\_K65R/V75I y O\_V75I/R78A, ya que también queríamos determinar posibles efectos sinérgicos entre las mutaciones seleccionadas, especialmente a nivel de su fidelidad.

### **4.3. Estudio de la estabilidad de las variantes de la RT del VIH-1 de grupo O en función de la temperatura**

#### **4.3.1. Análisis de la actividad DNA polimerasa dependiente de molde RNA a distintas temperaturas**

Se determinó la actividad DNA polimerasa dependiente de molde RNA de las RTs, utilizando sustratos homopoliméricos (poli(rA)/oligo(dT)) tras incubaciones de 5 min a distintas temperaturas. Como controles se usaron las RTs del MLV y del VIH-1 (aislado BH10). Además, se analizó la estabilidad de la RT del VIH-1 grupo O portadora del cambio V75I. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C en presencia de complejo molde-iniciador poly(rA)/oligo(dT)<sub>16</sub> y [<sup>3</sup>H]dTTP. La concentración de dTTP incorporado se midió tras incubaciones de 5 min de la enzima y el complejo molde-iniciador en un rango de temperaturas de 42-58°C (**Figura 26**). La actividad residual obtenida tras pre-incubar las

RTs a las distintas temperaturas se normalizó dividiendo el dato obtenido entre el valor determinado tras una pre-incubación de 5 min a 37°C (100% de la actividad de la enzima).



**Figura 26. Comparación de la estabilidad de las RTs a diferentes temperaturas.** La reacción de síntesis de DNA dependiente de molde RNA fue realizada a 37°C tras pre-incubaciones de 5 min de la RT y el complejo molde-iniciador a la temperatura indicada. En el caso de cada enzima, el porcentaje de actividad relativa para cada temperatura fue normalizada con el valor obtenido para esa enzima tras una pre-incubación a 37°C (siendo éste considerado el valor 100% de la actividad de la enzima). Los valores representados se obtuvieron de 4 ensayos independientes. Las constantes catalíticas de incorporación de nucleótidos determinadas tras una pre-incubación a 37°C para cada una de las enzimas fueron:  $0,72 \pm 0,28 \text{ s}^{-1}$  para O\_WT,  $0,92 \pm 0,25 \text{ s}^{-1}$  para O\_K65R,  $0,61 \pm 0,26 \text{ s}^{-1}$  para O\_K65R/V75I,  $0,45 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$  para O\_R78A,  $0,25 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$  para O\_V75I/R78A,  $0,57 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$  para O\_V75I,  $1,17 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$  para BH10\_WT,  $1,16 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$  para MLV.

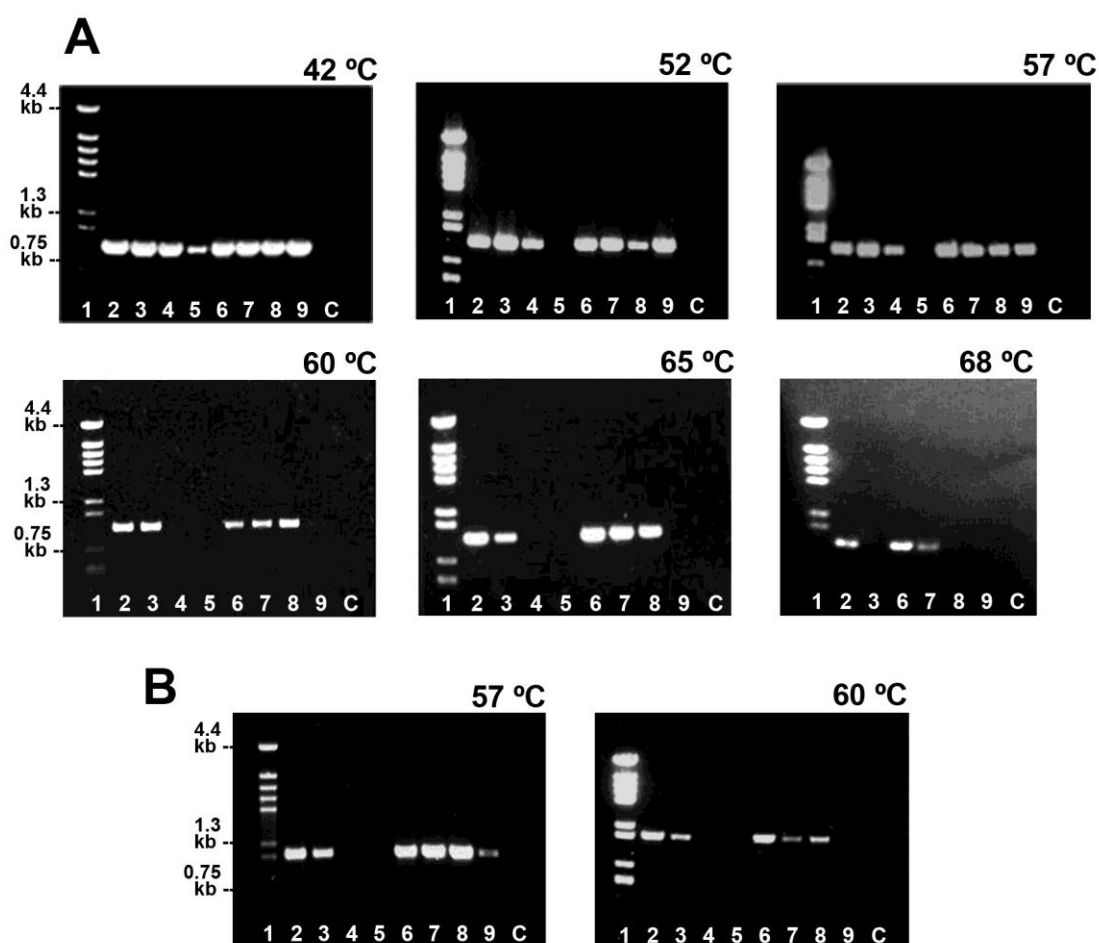
Las RT del MLV y las enzimas del VIH-1 grupo O portadoras de la mutación R78A, muestran una importante reducción de su actividad tras incubaciones a más de 50°C. A temperaturas elevadas, como por ejemplo 54°C, las RTs de grupo O (O\_WT, O\_V75I, O\_K65R y O\_K65R/V75I) mantienen entre un 25 y un 35% de su actividad a 37°C, mientras que la actividad residual de las enzimas del MLV y de BH10\_WT pasa a ser un 3 y un 6%, respectivamente. Las variantes de la RT del VIH-1 grupo O con la mutación R78A son menos estables que la enzima O\_WT y menos que la RT BH10\_WT. Estos mutantes muestran niveles muy bajos en su eficiencia de incorporación a 37°C, y su actividad específica es mucho menor que la obtenida para el resto de las RTs. Aunque

las diferencias son pequeñas, en los ensayos realizados a 56°C se puede observar que O\_WT, O\_K65R y O\_K65R/V75I son las enzimas que mantienen un mayor nivel de actividad.

#### **4.3.2. Análisis de la eficiencia de síntesis de cDNA a diferentes temperaturas mediante ensayos RT-PCR**

La eficiencia de la retrotranscripción a distintas temperaturas fue determinada mediante RT-PCR. Estos ensayos incluyen una etapa inicial de síntesis de cDNA a la temperatura de estudio y una segunda etapa de amplificación. La reacción de síntesis de cDNA se realizó a una temperatura dentro del rango de 42-68°C, en presencia de RNA total de hígado de ratón (50 ng/μl) y 150 nM de RT. En primer lugar se realizaron amplificaciones de un fragmento de actina de 0,9 kb, usando los oligonucleótidos ACT1 y ACT3. La baja actividad del doble mutante V75I/R78A ya se observa a 42°C. Su actividad cae rápidamente y a 52°C ya no muestra actividad. En la comparación de las RTs del VIH-1, las variantes de grupo O R78A y V75I/R78A son las que muestran los niveles más bajos de actividad, incluso la RT del MLV es mejor que estos dos mutantes en reacciones realizadas a 57°C (**Figura 27**). La temperatura más elevada en el análisis fue 68°C, a la cual se observa que solo las RTs O\_WT y O\_K65R mantienen una actividad óptima, observándose también que O\_V75I mantiene cierto nivel de actividad a esta temperatura.

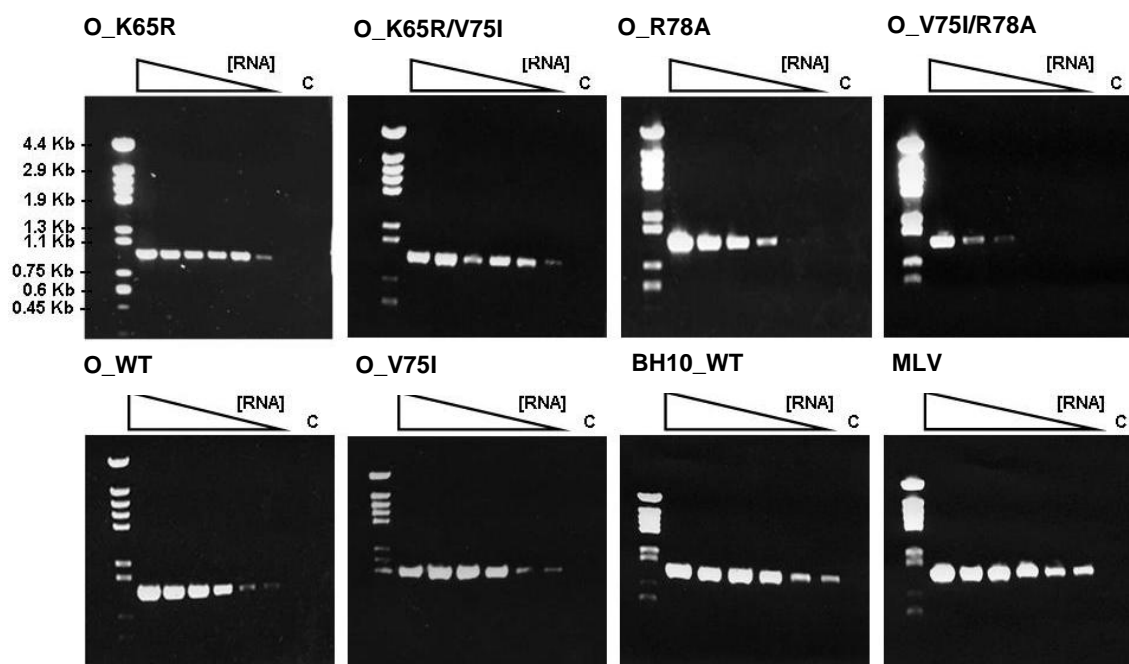
Con las RTs analizadas se realizó una reacción de RT-PCR con productos de mayor tamaño usando los oligonucleótidos TUB1 y TUB2 (1,2 kb). Como era de esperar, en la reacción realizada a 57°C, la RT de MLV es más eficiente que la RT portadora del cambio R78A, al igual que se veía en la amplificación de actina. En este caso la temperatura más alta a la que se llevo a cabo la reacción fue 60°C. En estas condiciones se confirmó la mayor eficiencia de síntesis de cDNA mostrada por las enzimas O\_WT y O\_K65R.



**Figura 27. Efecto de la temperatura sobre la síntesis de DNA dependiente de molde RNA analizado mediante RT-PCR.** La síntesis de cDNA se llevó a cabo incubando durante 60 min a la temperatura indicada, en un tampón de reacción que contenía 50 ng/μl de RNA y 15 nM de enzima activa. La reacción se detuvo mediante incubación a 92°C durante 10 min. En la mezcla de amplificación se usaron 2 μl de la reacción de síntesis de cDNA y 1,75 U de la DNA polimerasa Expand High Fidelity. **(A)** Amplificaciones de un fragmento de 0,9 kb del mRNA de actina, obtenido con los oligonucleótidos ACT1 y ACT3. **(B)** Amplificaciones de un fragmento de 1,2 kb del mRNA de tubulina, obtenido con los oligonucleótidos TUB1 y TUB2. El carril 1 muestra el marcador de pesos moleculares (DNA del fago Φ29 cortado con la enzima de restricción HindIII), y el carril C contiene la reacción control (realizada en ausencia de la RT). Los carriles del 2 al 9 muestran los resultados de la RT-PCR realizados con O\_K65R (carril 2), O\_K65R/V75I (carril 3), O\_R78A (carril 4), O\_V75I/R78A (carril 5), O\_WT (carril 6), O\_V75I (carril 7), BH10\_WT (carril 8), MLV (carril 9). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Por último, se estudió el efecto de la concentración de RNA en la eficiencia de la de la reacción de retrotranscripción a 47°C. Aunque la mayoría de las RTs son capaces de sintetizar cDNA en presencia de bajas concentraciones de RNA (10-50 ng), en nuestras condiciones de ensayo fue necesario partir de 75 ng para que la enzima O\_V75I/R78A catalizase la reacción de síntesis de cDNA (**Figura 28**). Se observa una mayor sensibilidad para la concentración de RNA por parte de las enzimas BH10\_WT y

MLV. Sin embargo los límites de detección para las enzimas de grupo O son más altos. Aunque se observa amplificación a bajas concentraciones, los niveles comparables a los obtenidos por las RTs del MLV o BH10\_WT se consiguen con una cantidad de RNA de 50 ng. La presencia de la mutación en la posición 65 en la RT del VIH-1 grupo O favorece la sensibilidad de la enzima, tanto en presencia como en ausencia del cambio V75I.



**Figura 28. Influencia de la concentración de RNA en la eficiencia de la síntesis de cDNA catalizada por las distintas RTs, analizada mediante RT-PCR.** Todas las reacciones se realizaron a 47°C durante 60 min con distintas concentraciones de RNA, y una concentración de 50 nM de enzima activa. Las reacciones se detuvieron mediante incubación a 92°C durante 10 min. En la mezcla de amplificación se usaron 2 µl de la reacción de síntesis de cDNA y 1,75 U de la DNA polimerasa Expand High Fidelity. Se amplificó un fragmento de 0,9 kb de mRNA de actina utilizando los oligonucleótidos ACT1 y ATC3. En cada uno de los geles se muestra el ensayo realizado por una de las RTs a distintas cantidades de RNA, que de izquierda a derecha fueron 1 µg, 100 ng, 75 ng, 50 ng, 25 ng y 10 ng. El control de la reacción se realizó en ausencia de enzima y se muestra en el carril C. El marcador de peso molecular mostrado en la parte izquierda de los geles es DNA del fago Φ29 cortado con la enzima de restricción HindIII. En cada gel se muestra un resultado representativo de dos experimentos independientes.

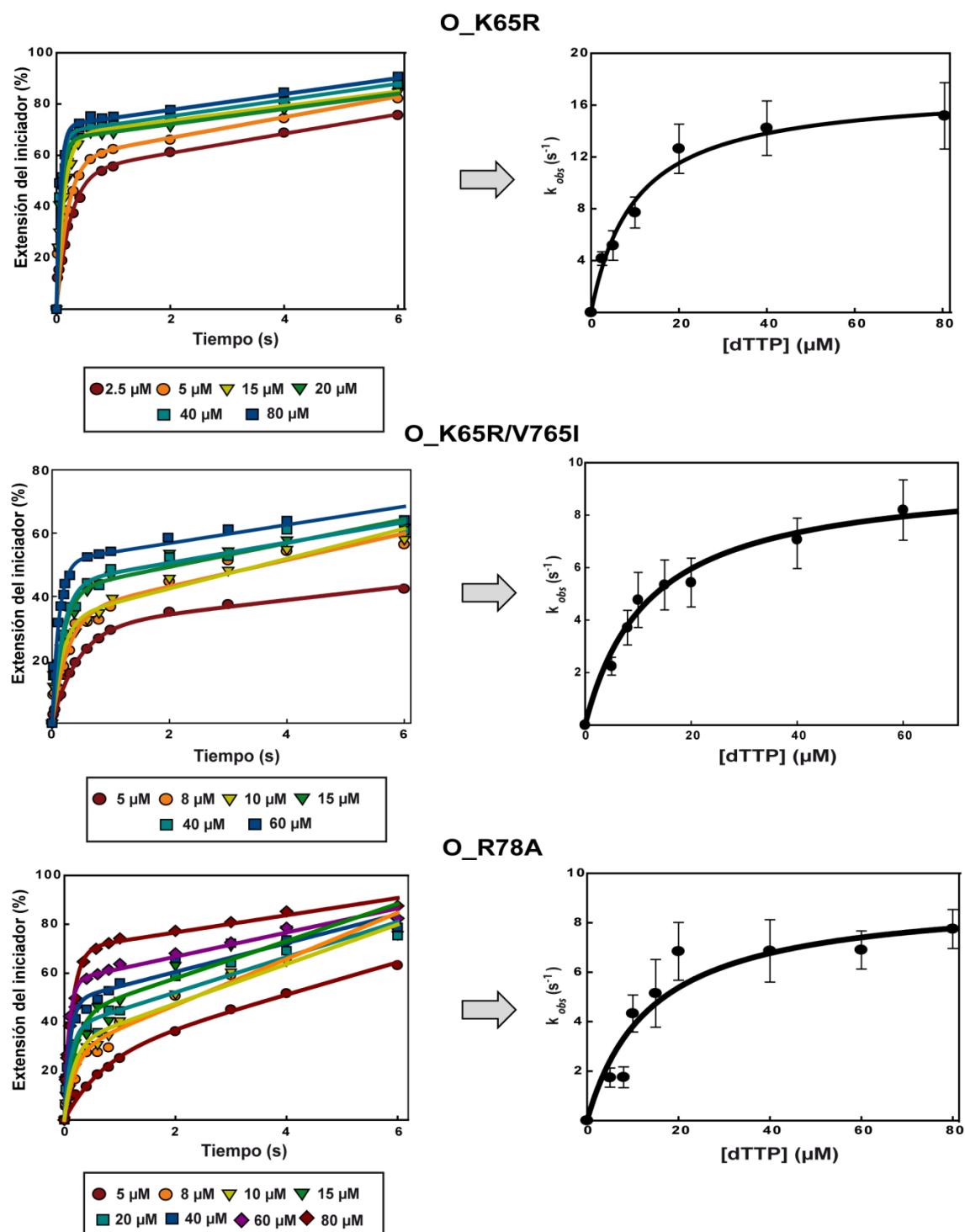
#### 4.3.3. Efecto de los cambios K65R, R78A y K65R/V75I en la RT del VIH-1 grupo O sobre su actividad DNA polimerasa

Una vez analizada la estabilidad de los nuevos mutantes se procedió a la comparación de su eficiencia catalítica de incorporación de nucleótidos correctos. Se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario para las RTs O\_K65R, O\_K65R/V75I y O\_R78A. No se caracterizó el doble mutante O\_V75I/R78A debido a su baja eficiencia catalítica en los ensayos de termoestabilidad presentados en las secciones anteriores. Las eficiencias catalíticas obtenidas para los mutantes se compararon con las de la enzima WT de grupo O. En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P cuya secuencia se muestra en la **Tabla 7**.

La velocidad de incorporación del nucleótido ( $k_{obs}$ ) se determinó en presencia de distintas concentraciones de dNTP. La dependencia de la velocidad de la reacción ( $k_{obs}$ ) con la concentración de nucleótido, se analizó ajustando los datos a una ecuación hiperbólica. Así, se obtuvo la velocidad máxima de incorporación de dNTP ( $k_{pol}$ ) y la constante de afinidad de unión del dNTP ( $K_d$ ) para las enzimas estudiadas (**Figura 29**). Los parámetros cinéticos obtenidos en el estado pre-estacionario se muestran en la **Tabla 14**. Se observa que los valores de eficacia catalítica para los mutantes son muy similares a los de la enzima O\_WT. Solo cabría destacar un descenso en dicha eficiencia en el caso de la enzima portadora del cambio R78A, que produce una disminución de la eficiencia de 2,3 veces respecto a los valores mostrados por la enzima O\_WT.

El mutante O\_K65R muestra una mayor afinidad por el dNTP (valores inferiores de  $K_d$ ). Por ello, este cambio produce un aumento de la eficacia catalítica de la enzima. Sin embargo, el valor de  $K_d$  es similar al obtenido para la RT “wild type” cuando la mutación K65R va acompañada del cambio V75I, valores que al mismo tiempo son muy similares a los obtenidos para la enzima O\_V75I.





**Figura 29. Parámetros cinéticos para la incorporación del nucleótido correcto (dTTP) en el estado pre-estacionario.** En la parte izquierda de la figura se muestran las cinéticas de incorporación del dTTP sobre el complejo molde-iniciador 31T/21P en el estado pre-estacionario de las RTs O\_K65R, O\_K65R/V75I y O\_R78A. A una mezcla pre-incubada con la RT (50 nM) y el 31T/21P marcado con <sup>32</sup>P en el extremo 5' del iniciador (100 nM) se le añadieron concentraciones crecientes de nucleótido en un tampón que contenía Mg<sup>2+</sup>. Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados y los productos se analizaron en geles de poliácridamida y urea. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación  $[P] = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t}) + k_{ss} \times t$ . En la parte derecha de la figura se representa la dependencia de la concentración del dTTP con la incorporación de este en el complejo molde-iniciador para cada enzima. Las velocidades de primer orden ( $k_{obs}$ ) obtenidas de los ajustes de los datos mostrados en las gráficas de la parte izquierda de la figura se representaron frente a las concentraciones de dTTP. La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a una ecuación hiperbólica. Los datos se ajustaron a la ecuación  $k_{obs} = k_{cat} \times [dNTP] / (K_d + [dNTP])$ .

**Tabla 14. Parámetros cinéticos de las RTs para la incorporación de nucleótido correcto, determinados en condiciones de estado pre-estacionario.**

Enzima	$k_{pol} (s^{-1})$	$K_d (\mu M)$	$k_{pol}/K_d (\mu M^{-1} \cdot s^{-1})$
O_WT <sup>a</sup>	14,7 ± 1,0	11,8 ± 2,9	1,25 ± 0,32
O_V75I <sup>a</sup>	13,9 ± 1,2	14,6 ± 4,3	0,96 ± 0,30
O_K65R	10,7 ± 0,9	5,8 ± 1,9	1,82 ± 0,60
O_K65R/V75I	12,7 ± 1,3	13,3 ± 3,7	0,95 ± 0,28
O_R78A	9,4 ± 1,1	17,2 ± 5,3	0,55 ± 0,18

Se usó el complejo 31T/21P. Los datos se muestran como el valor medio ± desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se realizó al menos tres veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

<sup>a</sup> Datos tomados de Álvarez *et al.* (2009).

#### 4.4. Análisis de la fidelidad de copia

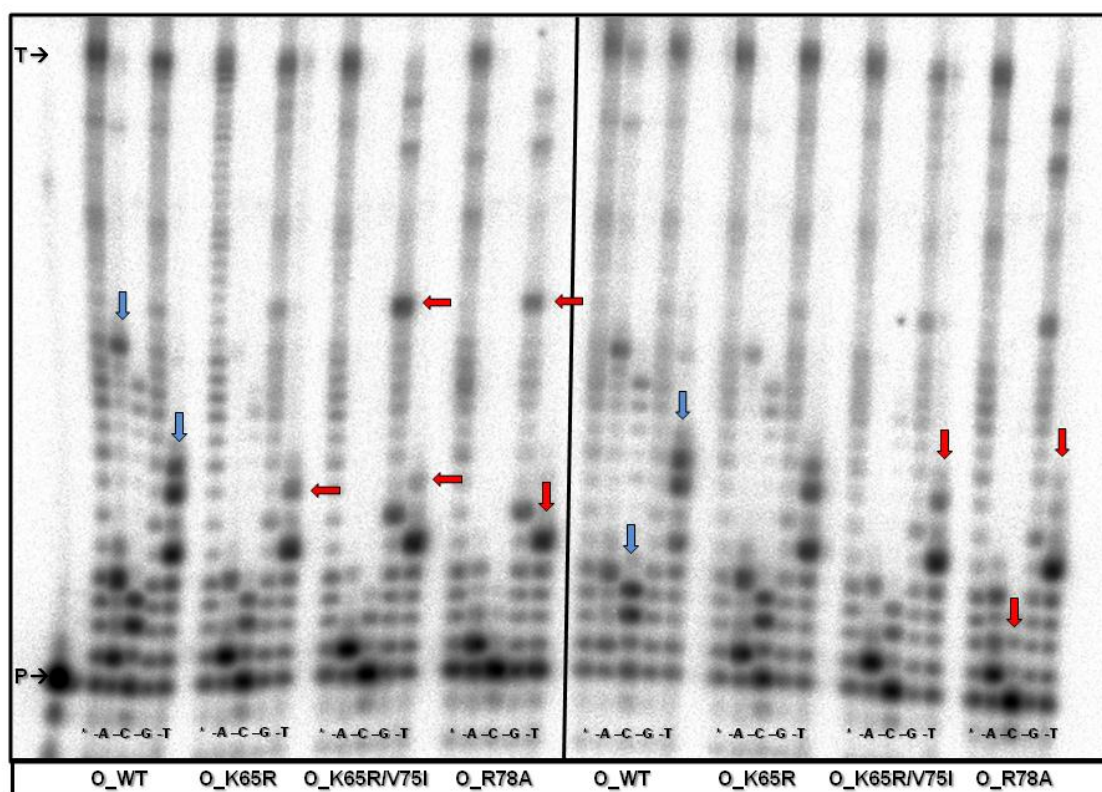
##### 4.4.1. Efecto de los cambios introducidos en la RT del VIH-1 grupo O sobre la fidelidad de copia dependiente de molde DNA en ensayos de exclusión de un nucleótido.

Se realizó un primer análisis cualitativo para medir los efectos de las mutaciones introducidas sobre la incorporación de nucleótidos incorrectos y su posterior extensión sobre la síntesis de DNA. El ensayo se realizó usando el complejo molde-iniciador M54/3TRP (**Tabla 7**) a una concentración de 30 nM. En la **Figura 30** se puede observar que todas las RTs fueron capaces de llevar a cabo la extensión total en presencia de los 4 dNTPs.

En los ensayos realizados en ausencia de uno de los dNTPs observamos fuertes paradas en el caso de las RTs mutantes. En este tipo de ensayos, los cambios que producen un mayor incremento de la fidelidad respecto a la RT O\_WT son K65R/V75I y R78A, en los que se observa una menor eficiencia de extensión del iniciador en ausencia de cualquiera de los 4 nucleótidos. Cabe destacar la parada que se produce como consecuencia de la ausencia del dCTP en todas las reacciones llevadas a cabo, pero que está fuertemente marcada en el caso de la enzima O\_R78A, que apenas es capaz de extender el iniciador en ausencia de este nucleótido. Observando la secuencia del molde se aprecia que la citosina sería el primer nucleótido correcto que se incorporaría en el DNA. Del mismo modo, en ausencia de dATP la enzima O\_WT es la que muestra los productos más largos, mientras que los mutantes O\_K65R, O\_K65R/V75I y O\_R78A solo

consiguen extender las cuatro primeras bases ya que el quinto nucleótido a incorporar sería dATP.

Cuando el ensayo se realizó en ausencia de dTTP se observaron dos tipos de paradas bien diferenciadas tras 5 min de incubación. Así, los mutantes de mayor fidelidad (O\_K65R/V75I y O\_R78A) muestran una primera parada que corresponde a la primera posición del molde en que aparece una adenosina. Sin embargo, en reacciones catalizadas por la enzima “wild type” se ve un producto más largo cuya parada coincide con la presencia en el molde de tres adenosinas seguidas, lo que puede dificultar la extensión del iniciador debido a la ausencia del nucleótido complementario en una secuencia homopolimérica.



**Figura 30. Extensión del iniciador 3TRP.** Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando un molde DNA (M54) y en ausencia de un dNTP. Con un asterisco (\*) se indican los pocillos en los que la mezcla de dNTPs contiene los 4 nucleótidos. Los carriles marcados con -A, -C, -G y -T indican la ausencia de ese nucleótido en la mezcla. Se tomaron alícuotas a los 5 min (izda) y 20 min (dcha) de reacción. P y T indican la posición del iniciador (3TRP) sin elongar de 22 nucleótidos de longitud y de la extensión total de 54 nucleótidos, respectivamente. Aparecen representadas en rojo las paradas más relevantes en la síntesis catalizada por las variantes en comparación con las de la enzima O\_WT (flechas azules).

Las diferencias de fidelidad están menos marcadas en el caso de la extensión en ausencia del dGTP. En ausencia de este nucleótido tanto la enzima O\_WT como la portadora del cambio K65R son capaces de extender totalmente el iniciador tras una reacción de 5 min. Son el doble mutante y la enzima O\_R78A los que muestran una mayor dificultad a la hora de extender el DNA en ausencia de este nucleótido.

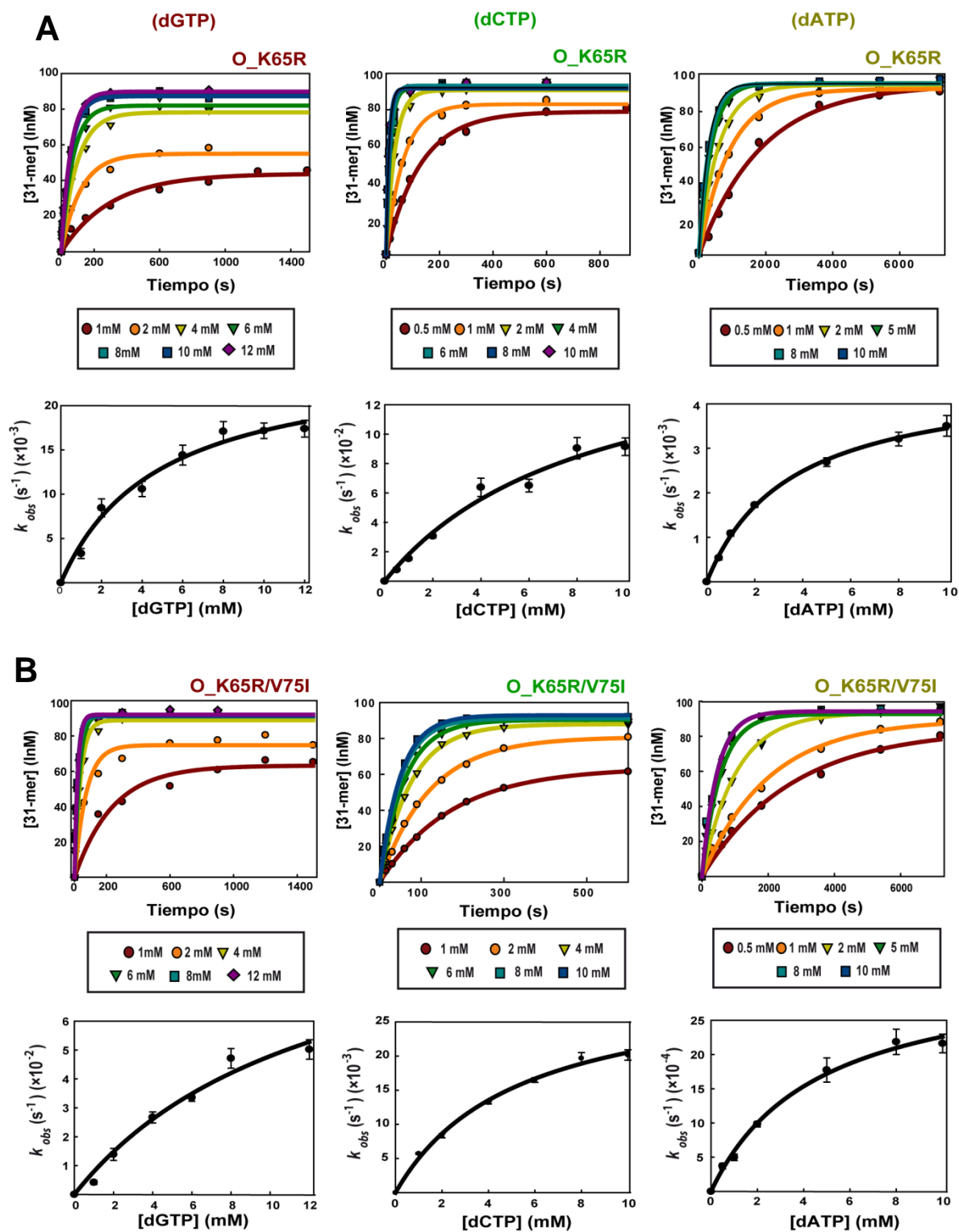
Además, se detuvo la reacción a distintos tiempos para comprobar si las diferencias de fidelidad se mantenían en el tiempo. Esto es lo que observamos en los ensayos realizados durante 20 min, en los que se siguen observando distintos tamaños en los productos de extensión en función de la enzima y del nucleótido ausente. Estos resultados sugieren que todos los mutantes seleccionados son más fieles que la RT O\_WT.

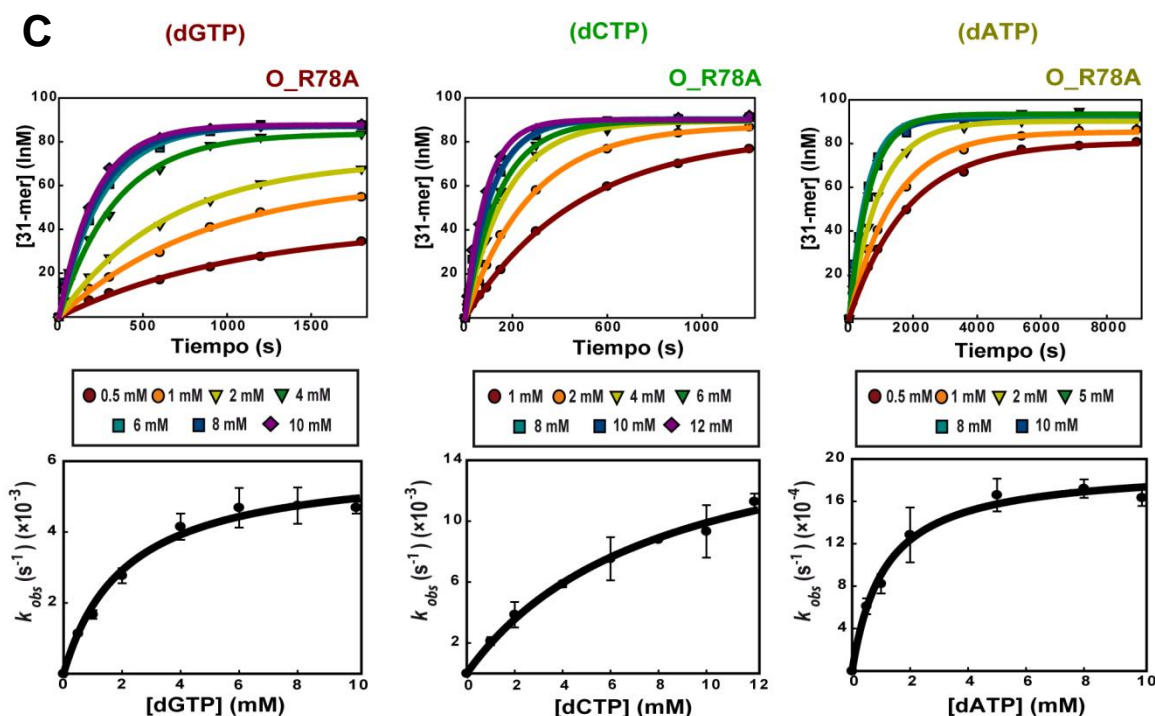
#### **4.4.2. Fidelidad de síntesis de DNA determinada a partir de los parámetros cinéticos de incorporación de dNTPs obtenidos en condiciones de estado pre-estacionario**

##### **4.4.2.1. Discriminación entre dNTPs correctos e incorrectos**

En estos ensayos se utilizó el complejo 31T/21P. Las cinéticas de incorporación del nucleótido correcto (dTTP) sobre el complejo 31T/21P para las enzimas estudiadas se muestran en la **Figura 31**. La dependencia de la velocidad de la reacción ( $k_{obs}$ ) con la concentración de nucleótido se analizó ajustando los datos a una ecuación hiperbólica. Así, se obtuvo la velocidad de la reacción ( $k_{pol}$ ) y la constante de afinidad del dNTP ( $K_d$ ) para las tres enzimas estudiadas. El ensayo se realizó en condiciones de único ciclo de incorporación, donde la enzima (120 nM) se añade en exceso con respecto al complejo molde-iniciador 31T/21P (100 nM). La cantidad de producto elongado se representó frente al tiempo. Los valores obtenidos se ajustaron a una curva exponencial simple para obtener las velocidades de incorporación ( $k_{obs}$ ) y las constantes de afinidad por el dNTP entrante ( $K_d$ ). Los parámetros cinéticos  $k_{pol}$  y  $K_d$  se obtuvieron ajustando los datos a una hipérbola (**Tabla 15**).

La eficiencias de incorporación de dCTP, dGTP o dATP mostradas por los mutantes que llevan el cambio K65R (O\_K65R y O\_K65R/V75I) son notablemente más bajas que las obtenidas con las mismas incorporaciones para la enzima O\_WT, lo que se traduce en un incremento significativo de la fidelidad exhibida por los mutantes. El doble mutante muestra un aumento de fidelidad especialmente marcado en la incorporación de A o C frente a A, aunque las diferencias con K65R son relativamente pequeñas.





**Figura 31. Determinación de los parámetros cinéticos para los nucleótidos incorrectos en condiciones de estado pre-estacionario.** Se representan las cinéticas de incorporación de nucleótidos incorrectos de las enzimas O\_K65R (A), O\_K65R/V75I (B) y O\_R78A (C), sobre un complejo 31T/21P en el estado pre-estacionario. A una mezcla pre-incubada de la RT (120 nM) y el 31T/21P marcado con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5' del iniciador (100 nM) se le añadieron concentraciones crecientes del nucleótido en un tampón que contenía  $\text{Mg}^{2+}$ . Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados y los productos se analizaron en geles de poliacrilamida y urea. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación  $[P] = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})$ . Las gráficas en negro representan la dependencia de la velocidad de incorporación del dNTP respecto a la concentración de éste. Las velocidades de primer orden ( $k_{obs}$ ) se representaron frente a las distintas concentraciones del dNTP. La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a una ecuación hiperbólica. Los datos se ajustaron a la ecuación  $k_{obs} = k_{pol} \times [\text{dNTP}] / (K_d + [\text{dNTP}])$ .

El análisis cinético muestra que la presencia de la mutación K65R produce también una reducción en el valor  $k_{pol}$  para la incorporación de nucleótidos incorrectos en comparación con la RT mutante portadora del cambio V75I.

Las eficiencias de incorporación errónea de G o A frente A de la RT O\_WT y el mutante O\_R78A fueron muy similares. Sin embargo, el incremento de fidelidad característico de la enzima que porta esta mutación se observa en su capacidad para discriminar entre C y T cuando en el molde parece una adenina.

**Tabla 15. Parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos correctos e incorrectos para la RT del VIH-1 grupo O (O\_WT) y los mutantes O\_V75I, O\_K65R, O\_K65R/V75I, O\_R78A y O\_V75I/R78A.**

Enzima	Nucleótido	$k_{pol}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_d$ (μM)	$k_{pol}/K_d$ (μM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	$f_{inc}^a$
O_WT <sup>b</sup>	dTTP	14,7 ± 1,0	11,8 ± 2,9	1,25 ± 0,32	
	dCTP	0,72 ± 0,10	7652 ± 2083	(9,5 ± 2,9) × 10 <sup>-5</sup>	7,57 × 10 <sup>-5</sup>
	dGTP	0,15 ± 0,03	11730 ± 3750	(1,3 ± 0,5) × 10 <sup>-5</sup>	1,03 × 10 <sup>-5</sup>
	dATP	(7,3 ± 0,2) × 10 <sup>-3</sup>	1485 ± 150	(4,9 ± 2,2) × 10 <sup>-6</sup>	3,94 × 10 <sup>-6</sup>
O_V75I <sup>b</sup>	dTTP	13,9 ± 1,2	14,6 ± 4,3	0,96 ± 0,30	
	dCTP	0,27 ± 0,05	11023 ± 3792	(2,4 ± 0,9) × 10 <sup>-5</sup>	2,54 × 10 <sup>-5</sup> (3,0)
	dGTP	(6,3 ± 0,9) × 10 <sup>-2</sup>	7481 ± 2307	(8,4 ± 2,9) × 10 <sup>-6</sup>	8,76 × 10 <sup>-6</sup> (1,2)
	dATP	(2,2 ± 0,2) × 10 <sup>-3</sup>	2308 ± 720	(9,5 ± 3,1) × 10 <sup>-7</sup>	9,98 × 10 <sup>-7</sup> (3,9)
O_K65R	dTTP	10,7 ± 0,9	5,8 ± 1,9	1,82 ± 0,60	
	dCTP	0,17 ± 0,02	9559 ± 1908	(1,7 ± 0,4) × 10 <sup>-5</sup>	9,51 × 10 <sup>-6</sup> (8,0)
	dGTP	(3,1 ± 1,9) × 10 <sup>-2</sup>	6452 ± 857	(4,8 ± 0,7) × 10 <sup>-6</sup>	2,66 × 10 <sup>-6</sup> (3,9)
	dATP	(4,8 ± 0,1) × 10 <sup>-3</sup>	3680 ± 178	(1,3 ± 0,1) × 10 <sup>-6</sup>	7,09 × 10 <sup>-7</sup> (5,6)
O_K65R/V75I	dTTP	12,7 ± 1,3	13,3 ± 3,7	0,95 ± 0,28	
	dCTP	(3,3 ± 0,3) × 10 <sup>-2</sup>	5686 ± 995	(5,8 ± 1,1) × 10 <sup>-6</sup>	6,06 × 10 <sup>-6</sup> (12,5)
	dGTP	0,11 ± 0,02	13430 ± 4605	(8,3 ± 3,3) × 10 <sup>-6</sup>	8,70 × 10 <sup>-6</sup> (1,2)
	dATP	(3,3 ± 0,2) × 10 <sup>-3</sup>	5290 ± 553	(6,2 ± 0,7) × 10 <sup>-7</sup>	6,52 × 10 <sup>-7</sup> (6,0)
O_R78A	dTTP	9,4 ± 1,1	17,2 ± 5,3	0,55 ± 0,18	
	dCTP	(1,64 ± 0,21) × 10 <sup>-2</sup>	6939 ± 1740	(2,35 ± 0,66) × 10 <sup>-6</sup>	4,27 × 10 <sup>-6</sup> (17,7)
	dGTP	(6,23 ± 0,35) × 10 <sup>-3</sup>	2313 ± 361	(2,69 ± 0,45) × 10 <sup>-6</sup>	4,89 × 10 <sup>-6</sup> (2,1)
	dATP	(1,93 ± 0,74) × 10 <sup>-3</sup>	1122 ± 165	(1,72 ± 0,26) × 10 <sup>-6</sup>	3,13 × 10 <sup>-6</sup> (1,4)

Se usó el complejo 31T/21P. Los datos se muestran como el valor medio ± desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se realizó al menos tres veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

<sup>a</sup> Eficiencia de incorporación errónea;  $f_{inc} = [k_{pol}(\text{incorrecto})/K_d(\text{incorrecto}) / k_{pol}(\text{correcto})/K_d(\text{correcto})]$ , donde los nucleótidos incorrectos fueron dCTP, dGTP y dATP. Entre paréntesis se indica el incremento de fidelidad respecto a la enzima O\_WT. Los valores se obtuvieron dividiendo los datos de  $f_{inc}$  de O\_WT entre los valores de las  $f_{inc}$  de las demás enzimas.

<sup>b</sup> Datos tomados de Álvarez *et al.* (2009).

#### 4.4.2.2. Extensión de complejos molde-iniciador con extremos desapareados

Los parámetros cinéticos obtenidos para la incorporación de nucleótidos correctos e incorrectos nos muestran un claro aumento en la fidelidad de copia de las enzimas mutantes portadoras de los cambios con respecto a la RT “wild type”. Para completar el estudio cinético de fidelidad se determinaron los parámetros cinéticos de incorporación de nucleótido en ensayos de extensión de complejos molde-iniciador con extremos desapareados. Se determinaron las cinéticas de incorporación del nucleótido correcto

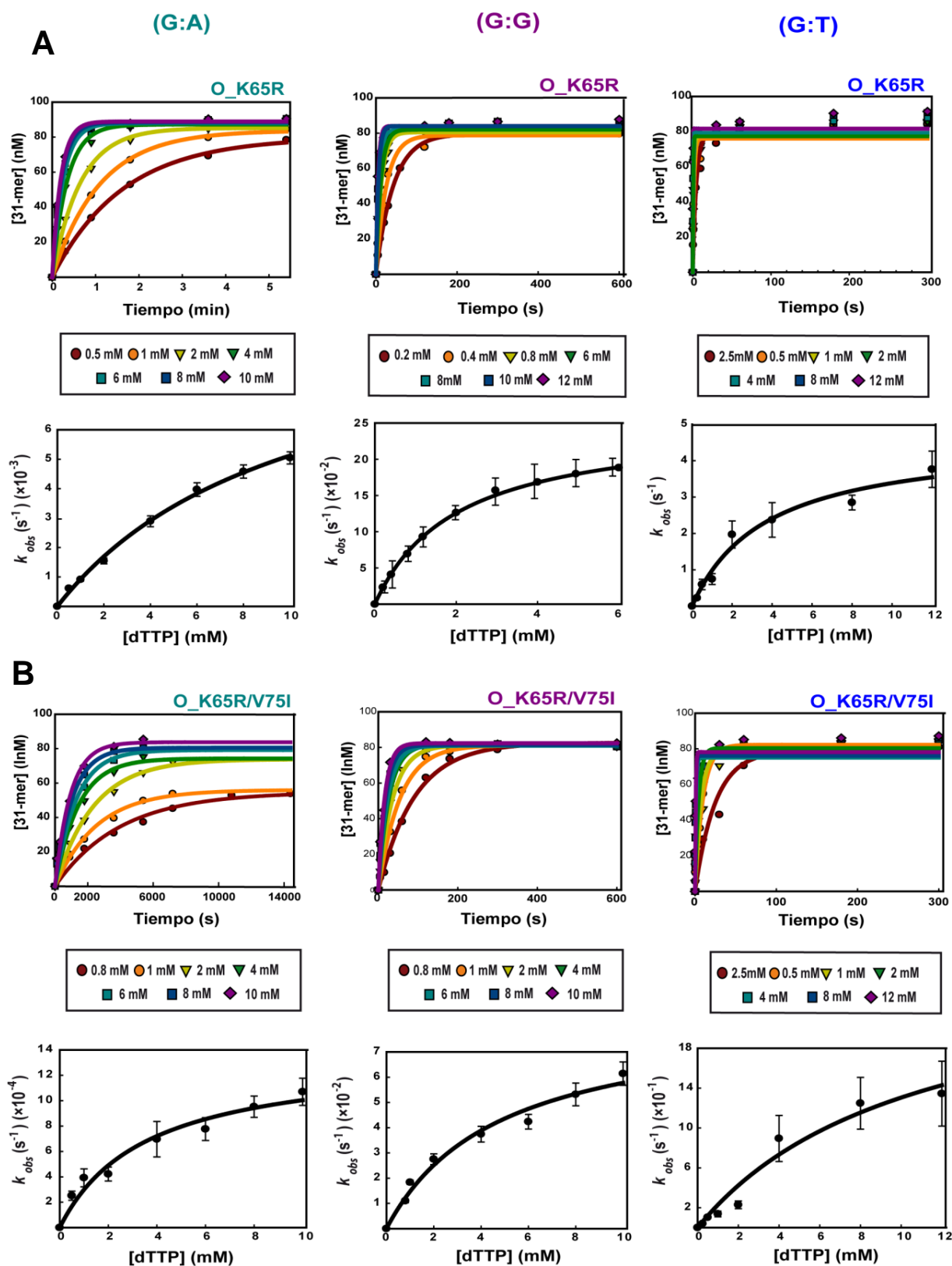


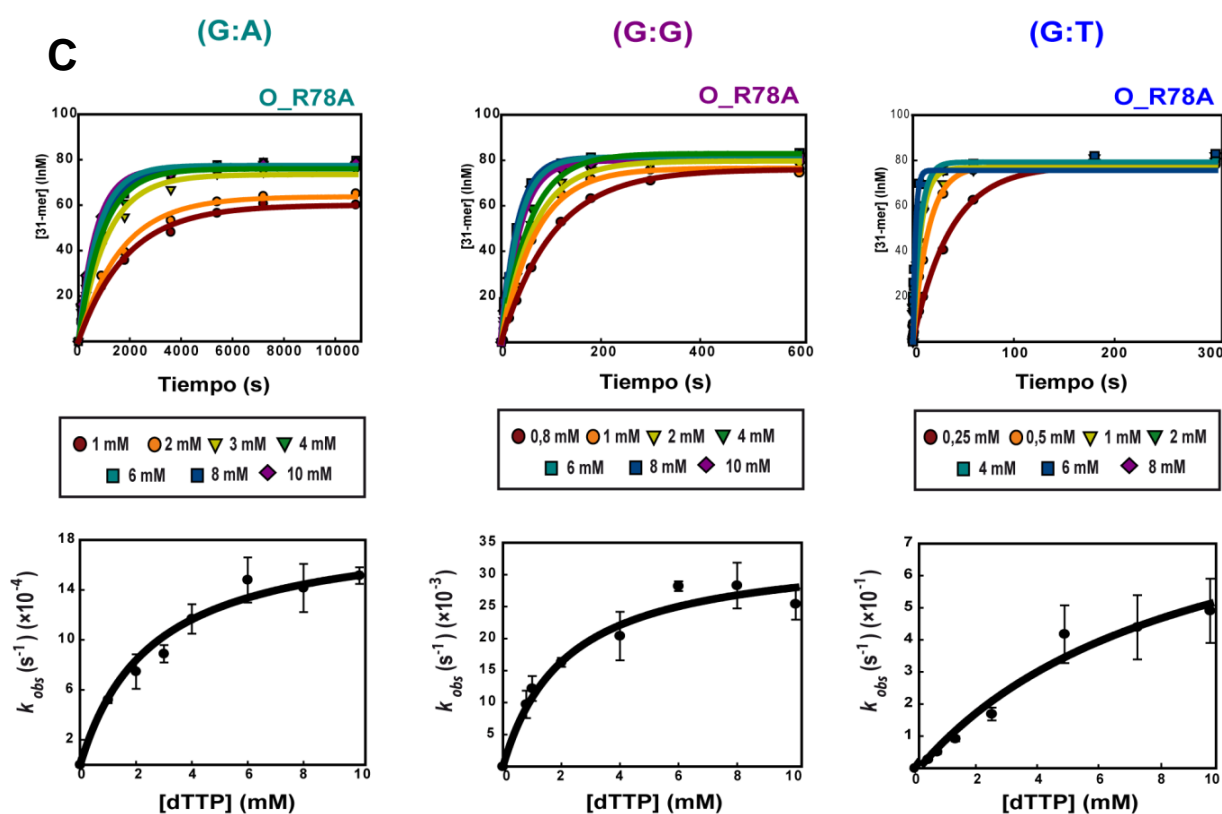
dTTP frente a adenosina, usando tres tipos de complejos desapareados en su extremo 3' (G:T, G:G o G:A). Las constantes de velocidad ( $k_{obs}$ ) se determinaron bajo condiciones de ciclo único de polimerización, utilizando un exceso de enzima (120 nM) sobre el sustrato (100 nM) y midiendo la cantidad de producto formado a distintas concentraciones del dTTP. La representación de la  $k_{obs}$  frente a la concentración de dTTP se ajustó a una hipérbola (**Figura 32**).

De esta forma se obtuvieron los parámetros cinéticos ( $k_{pol}$  y  $K_d$ ) de las RTs estudiadas. Estos parámetros se muestran en la **Tabla 16**. Las eficiencias de extensión estuvieron comprendidas en los rangos de  $2,43 \times 10^{-4}$  a  $2,3 \times 10^{-3}$  para G:T, y de  $1,77 \times 10^{-5}$  a  $3,95 \times 10^{-4}$  para G:G. En el caso de la extensión de extremos G:A, los valores obtenidos fueron inferiores a  $2,2 \times 10^{-6}$ . Las RTs O\_K65R y O\_V75I producen un incremento moderado en la fidelidad, mostrando eficiencias de extensión entre 2 y 5,4 veces menores que las de la enzima “wild type”.

Sin embargo, con este tipo de ensayos también podemos observar el gran incremento de fidelidad de la enzima portadora de los cambios K65R/V75I, para la que se observa una reducción de entre 9,5 y 22,3 veces de su eficiencia de extensión de extremos desapareados G:T y G:G, respectivamente. En el caso de la extensión de extremos G:T, el aumento de fidelidad puede ser atribuido a que el doble mutante tiene una afinidad menor por el dNTP (efecto sobre la  $K_d$ ). Sin embargo, en el caso de G:G, el efecto se debe a una reducción de la velocidad en la incorporación del dTTP en el complejo desapareado. El mutante portador del cambio R78A también es más fiel en la extensión de los extremos desapareados G:T y G:G. Al igual que en el caso de la RT O\_K65R/V75I, la discriminación se debe al efecto de la mutación sobre los parámetros cinéticos  $k_{pol}$  y  $K_d$ , respectivamente.







**Figura 32. Cálculo de los parámetros cinéticos para la extensión de extremos desapareados en condiciones de estado pre-estacionario.** Se representan las cinéticas de extensión de las enzimas O\_K65R (A), O\_K65R/V75I (B) y O\_R78A (C), sobre tres complejos molde-iniciador: 31T/21PA, 31T/21PG y 31T/21PT en el estado pre-estacionario. A una mezcla pre-incubada de la RT (120 nM) y el correspondiente complejo marcado con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5' del iniciador (100 nM) se le añadieron concentraciones crecientes del dTTP en un tampón que contenía  $\text{Mg}^{2+}$ . Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados y los productos se analizaron en geles de poliacrilamida y urea. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación  $[P] = A \times (1 - e^{-k_{\text{obs}} \times t})$ . Las gráficas en negro representan la dependencia de la concentración del dTTP con la incorporación de este en el complejo molde-iniciador. Las velocidades de primer orden ( $k_{\text{obs}}$ ) se representaron frente a las distintas concentraciones del dNTP. La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a una ecuación hiperbólica. Los datos se ajustaron a la ecuación  $k_{\text{obs}} = k_{\text{pol}} \times [\text{dNTP}] / (K_d + [\text{dNTP}])$ .

**Tabla 16. Parámetros cinéticos para la incorporación de dTTP en ensayos de extensión de extremos desapareados catalizados por la enzima O\_WT y los mutantes O\_V75I, O\_K65R, O\_K65R/V75I y O\_R78A.**

Enzima	Par de bases en posición 3' <sup>a</sup>	$k_{pol}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_d$ (μM)	$k_{pol}/K_d$ (μM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$f_{ext}$ <sup>b</sup>
O_WT <sup>c</sup>	G:C	14,7 ± 1,0	11,8 ± 2,9	1,25 ± 0,32	
	G:T	7,6 ± 0,9	2638 ± 785	(2,9 ± 0,9) × 10 <sup>-3</sup>	2,30 × 10 <sup>-3</sup>
	G:G	0,56 ± 0,07	1132 ± 316	(4,9 ± 1,5) × 10 <sup>-4</sup>	3,95 × 10 <sup>-4</sup>
	G:A	(2,1 ± 0,3) × 10 <sup>-2</sup>	7817 ± 2334	(2,7 ± 0,9) × 10 <sup>-6</sup>	2,17 × 10 <sup>-6</sup>
O_V75I <sup>c</sup>	G:C	13,9 ± 1,2	14,6 ± 4,3	0,96 ± 0,30	
	G:T	2,8 ± 0,2	4400 ± 789	(6,3 ± 1,2) × 10 <sup>-4</sup>	6,56 × 10 <sup>-4</sup> (3,5)
	G:G	0,32 ± 0,01	2426 ± 178	(1,3 ± 0,1) × 10 <sup>-4</sup>	1,39 × 10 <sup>-4</sup> (2,8)
	G:A	(6,8 ± 0,8) × 10 <sup>-3</sup>	12110 ± 2536	(5,6 ± 1,3) × 10 <sup>-7</sup>	5,86 × 10 <sup>-7</sup> (3,7)
O_K65R	G:C	10,7 ± 0,9	5,8 ± 1,9	1,82 ± 0,60	
	G:T	3,1 ± 0,5	2214 ± 1058	(1,4 ± 0,7) × 10 <sup>-3</sup>	7,80 × 10 <sup>-4</sup> (2,9)
	G:G	0,19 ± 0,02	1416 ± 328,4	(1,3 ± 0,3) × 10 <sup>-4</sup>	7,25 × 10 <sup>-5</sup> (5,4)
	G:A	(1,3 ± 0,2) × 10 <sup>-2</sup>	15180 ± 4239	(8,7 ± 2,9) × 10 <sup>-7</sup>	4,78 × 10 <sup>-7</sup> (4,5)
O_K65R/V75I	G:C	12,7 ± 1,3	13,3 ± 3,7	0,95 ± 0,28	
	G:T	2,4 ± 0,2	10450 ± 1644	(2,3 ± 0,4) × 10 <sup>-4</sup>	2,43 × 10 <sup>-4</sup> (9,5)
	G:G	(8,7 ± 0,9) × 10 <sup>-2</sup>	5213 ± 1096	(1,7 ± 0,4) × 10 <sup>-5</sup>	1,77 × 10 <sup>-5</sup> (22,3)
	G:A	(1,4 ± 0,1) × 10 <sup>-3</sup>	3578 ± 786	(3,9 ± 0,9) × 10 <sup>-7</sup>	4,15 × 10 <sup>-7</sup> (5,2)
O_R78A	G:C	9,4 ± 1,1	17,2 ± 5,3	0,55 ± 0,18	
	G:T	1,42 ± 0,21	>8000	ND	ND
	G:G	(3,40 ± 0,27) × 10 <sup>-2</sup>	2158 ± 484	(1,58 ± 0,37) × 10 <sup>-5</sup>	2,87 × 10 <sup>-5</sup> (13,8)
	G:A	(2,00 ± 0,15) × 10 <sup>-3</sup>	2926 ± 572	(6,84 ± 1,43) × 10 <sup>-7</sup>	1,24 × 10 <sup>-6</sup> (1,8)

Se usaron los complejos 31T/21P, 31T/21PT, 31T/21PG y 31T/21PA. Los datos se muestran como el valor medio ± desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se realizó al menos tres veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%. ND: No determinado.

<sup>a</sup> La primera base corresponde al molde y la segunda al iniciador.

<sup>b</sup> Eficiencia de extensión de extremos desapareados viene dada por la expresión:

$f_{ext} = [k_{pol}(\text{desapareado})/K_d(\text{desapareado}) / k_{pol}(\text{apareado})/K_d(\text{apareado})]$ . Entre paréntesis se indica el incremento de fidelidad respecto a la enzima O\_WT. Los valores se obtuvieron dividiendo los datos de  $f_{ext}$  de O\_WT entre los valores de las  $f_{ext}$  de las demás enzimas.

<sup>c</sup> Datos tomados de Alvarez *et al.* (2009).

#### 4.4.3. Determinación de la fidelidad de copia dependiente de molde DNA mediante ensayos genéticos de introducción de mutaciones

El ensayo de introducción de mutaciones basado en la expresión del gen *lacZ* utilizando el fago M13mp2 se empleó para determinar cómo afectaban las distintas mutaciones introducidas en la enzima a su fidelidad intrínseca. Las mutaciones silenciosas no son detectadas en este ensayo ya que no producen ningún cambio en la actividad para la que codifica el gen marcador. Sin embargo, el ensayo con el fago M13mp2 que utiliza el *lacZ* como gen marcador, tiene un amplio número de posibles dianas mutacionales que provocan un cambio fenotípico detectable (Figura 17). La frecuencia de mutantes se calculó tras haber contado el total de placas y tras la selección

y secuenciación de los mutantes identificados, como la relación entre el número de placas mutantes y el número de placas totales (**Tabla 17**).

**Tabla 17. Fidelidad de las RTs medida mediante ensayos genéticos**

Enzimas	Placas Totales	Placas Mutantes	Frecuencia de mutantes	Variación de fidelidad	
				Respecto a la RT O_WT	Respecto a la RT del MLV
<b>O_WT</b>					
<b>Experimento 1<sup>a</sup></b>	7579	63	0,00831	-	0,16
<b>Experimento 2</b>	8698	63	0,00724	-	0,18
<b>Experimento 3</b>	5063	40	0,00790	-	0,17
<b>O_K65R</b>	75474	58	0,00077	9,4-10,8	<b>1,8</b>
<b>O_K65R/V75I</b>	55657	50	0,00089	8,1-9,3	<b>1,6</b>
<b>O_V75I<sup>a</sup></b>	9894	47	0,00475	1,5-1,7	0,28
<b>O_R78A</b>	80664	48	0,00059	12,3-14,1	<b>2,4</b>
<b>MLV<sup>b</sup></b>	29648	40	0,00135	5,4-6,2	-

Datos obtenidos como resultado del análisis de 4-6 reacciones diferentes de rellenado del “gapped DNA” realizadas para cada enzima. Considerándose un fondo o “background” inferior a  $4,5 \times 10^{-5}$ .

<sup>a</sup> Datos tomados de Álvarez *et al.* (2009).

<sup>b</sup> RT del MLV comercial suministrada por Promega Corp. (nº de catálogo: M1701)

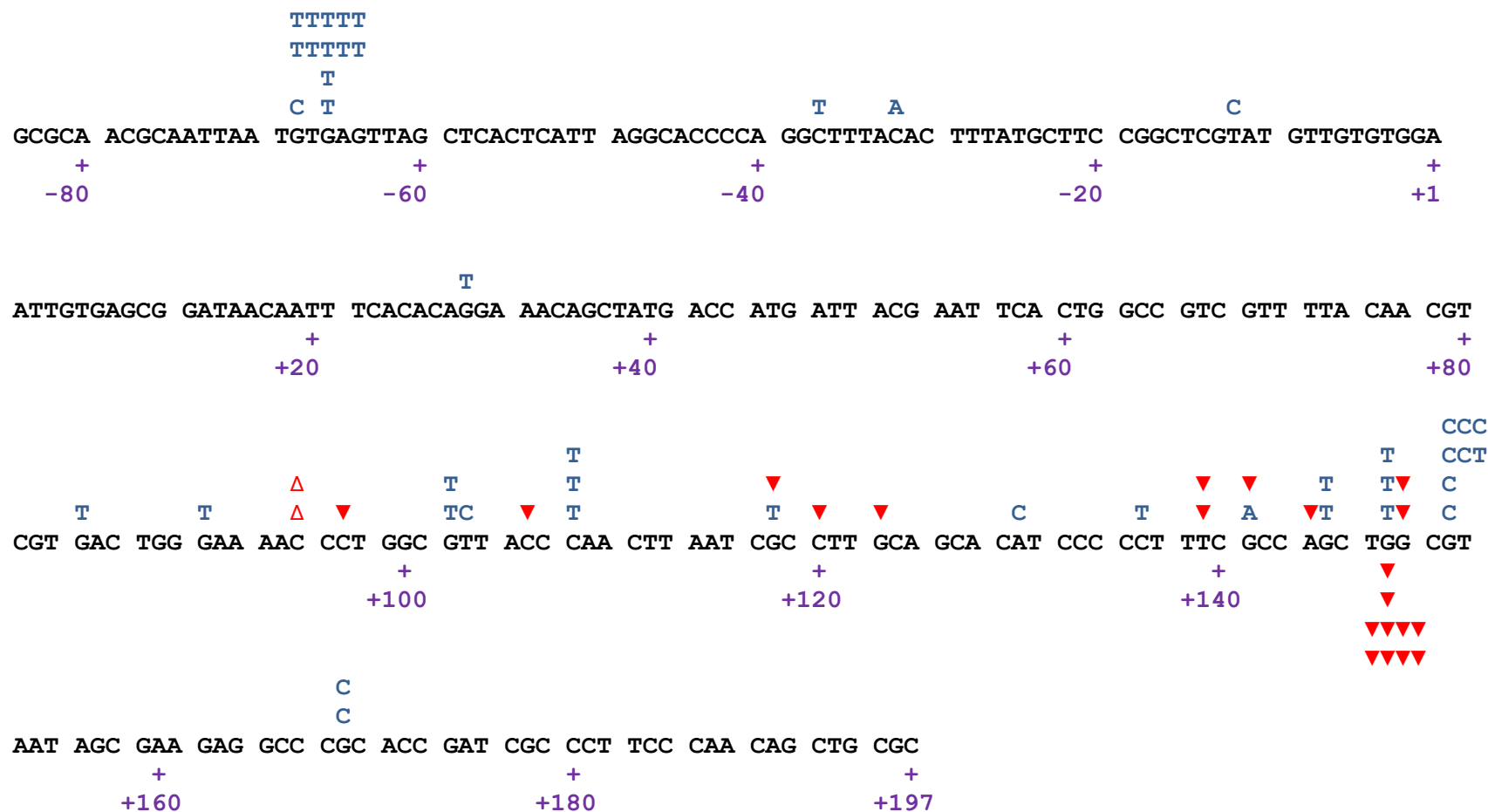
Según los datos proporcionados por este ensayo, las RTs mutantes O\_K65R, O\_K65R/V75I y O\_R78A producen un incremento medio de 10 veces de la fidelidad de copia con respecto a la RT O\_WT, Además, sus frecuencias de mutantes son entre 1,5 y 2,3 veces más bajas que las calculadas para la RT del MLV. Por otro lado, pudimos observar que aunque por sí sola V75I confiere un incremento de fidelidad de 1,7 veces, este cambio no produce ningún efecto sobre la fidelidad cuando la mutación K65R está presente.

Los tipos de mutaciones introducidas por las RTs mutantes obtenidas se identificaron tras secuenciar el gen *lacZ* de los fagos aislados de las placas azul claro o incoloras (**Figuras 33, 34 y 36**). Sus espectros fueron comparados con los obtenidos para las RTs O\_WT (**Figura 23**) y O\_V75I (**Figura 35**). Los espectros de mutaciones obtenidos con las RTs O\_K65R, O\_K65R/V75I y O\_R78A parecen tener una distribución mucho más amplia en cuanto a cambios de base, observándose una menor presencia de “hot spots” de mutaciones. A pesar de ello, se ha podido observar cierta concentración de algunos cambios. En las tres enzimas aparece un “hot spot” alrededor de las posiciones -

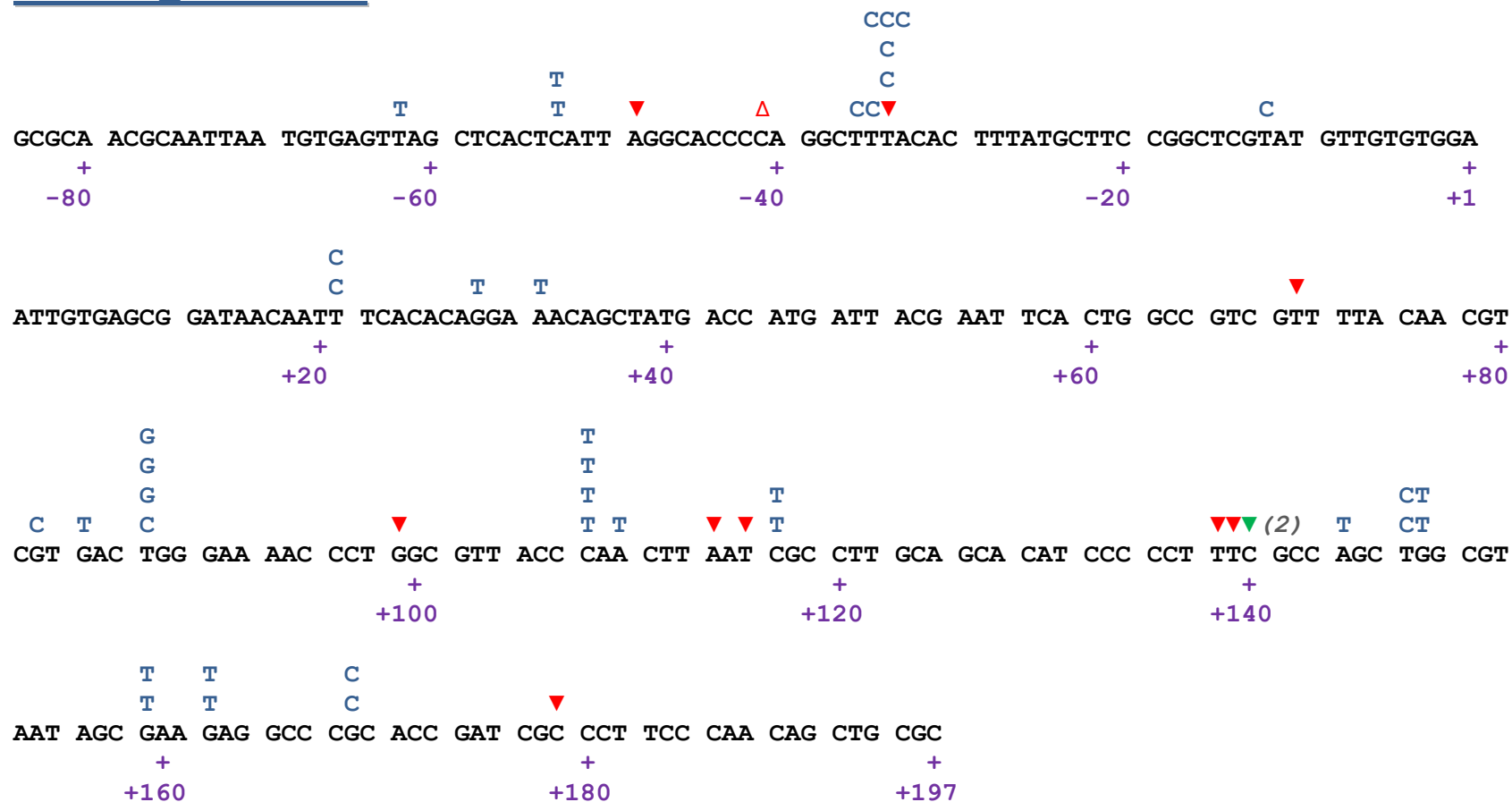
36 y -34, en una región homopolimérica de Ts. En este “hot spot” se observan cambios T→C tanto en la RT O\_R78A como en O\_K65R/V75I. Por otro lado, la RT O\_K65R muestra varias zonas con acumulación de mutaciones, en las posiciones -66 (G→T), +148 (delecion o G→T) y +151 (mayoritariamente G→C).

En la **Tabla 18** se resumen los cambios producidos por cada enzima y se muestran las tasas de error obtenidas para cada tipo de mutación y cambio de pauta de lectura. A diferencia de lo que ocurre con la enzima O\_WT y con la RT O\_V75I, los errores de cambio en el marco de lectura representan entre un 15,7% y un 34,3% del total de cambios observados en las tres enzimas mutantes, O\_K65R, O\_K65R/V75I y O\_R78A. Estas RTs muestran una tendencia a generar deleciones de un nucleótido. En el caso de O\_K65R y O\_R78A, los errores tienden a acumularse en zonas heteropoliméricas. En el espectro de mutaciones de la RT del MLV (**Figura 22**) los cambios en el marco de lectura representan más del 50% del total. Además, la RT O\_K65R y, en menor medida la RT O\_R78A muestran una gran tendencia a generar transversiones en vez de transiciones, una propiedad que es compartida con la RT del MLV.

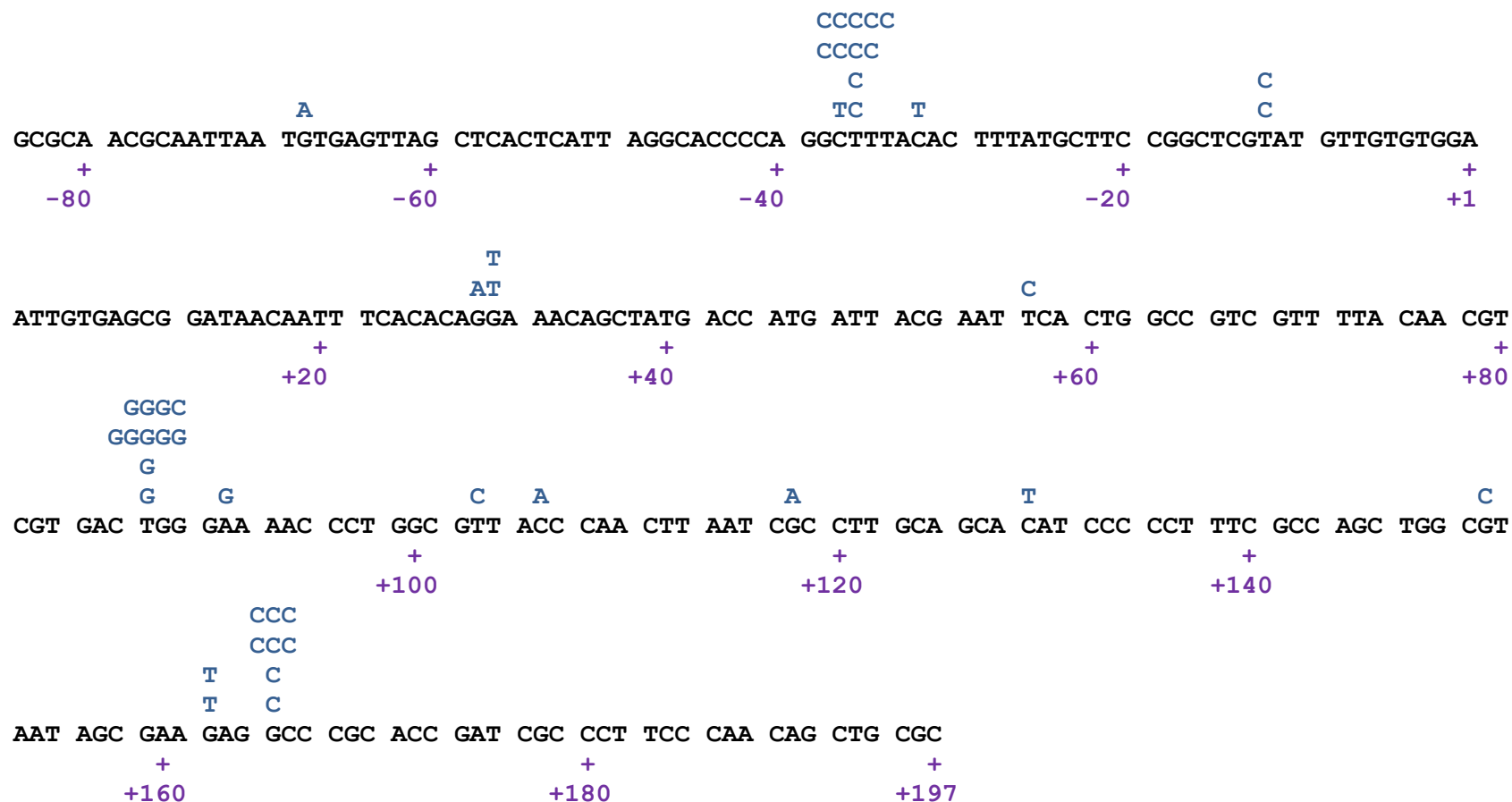
## RT de O\_K65R



**Figura 33. Espectro de mutaciones inducidas por la RT O\_K65R durante la síntesis de DNA dependiente de molde DNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo (▲). Las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido (▼).

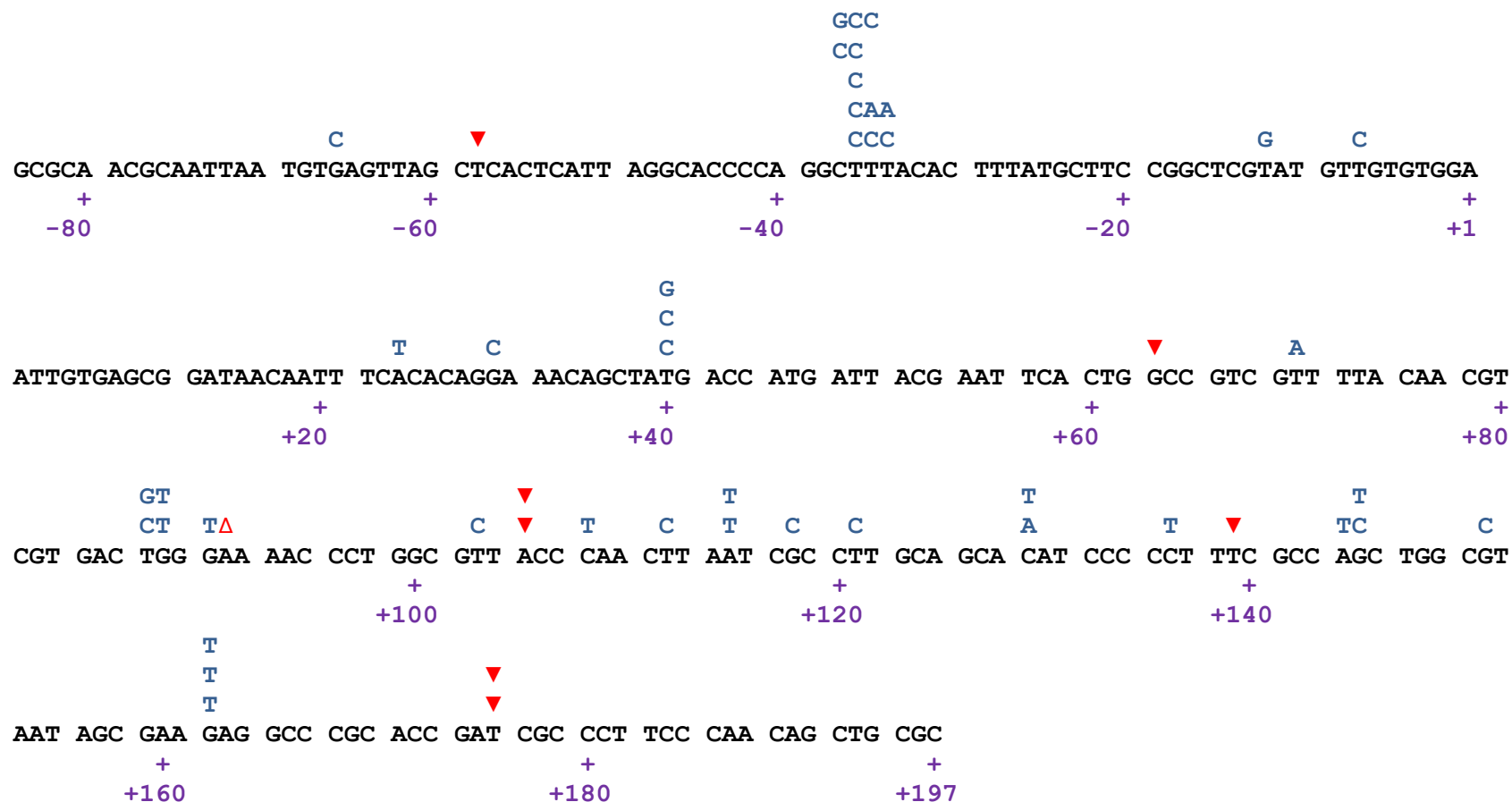
RT de O\_K65R/V75I

**Figura 34. Espectro de mutaciones inducidas por la RT O\_K65R/V75I durante la síntesis de DNA dependiente de molde DNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo (Δ). Las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido (▼). Las deleciones largas se muestran con el triángulo verde relleno invertido (▼) indicando entre paréntesis el número de bases que se han perdido y colocando el símbolo en la base en la que comienza la deleción (dirección 5'→3').

RT de O\_V75I

**Figura 35. Espectro de mutaciones inducidas por la RT de O\_V75I durante la síntesis de DNA dependiente de molde DNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Espectro obtenido de Álvarez *et al.* (2009).



RT de O\_R78A

**Figura 36. Espectro de mutaciones inducidas por la RT O\_R78A durante la síntesis de DNA dependiente de molde DNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo (▲). Las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido (▼).

**Tabla 18. Resumen de las tasas de error para cada RT en función de la clase de mutación producida en la síntesis de DNA dependiente de molde DNA.**

Errores	O_WT <sup>a</sup>		O_V75I <sup>a</sup>		O_K65R		O_K65R/V75I		O_R78A		MLV <sup>b</sup>	
	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error
<b>Todos</b>	49	1/17166	47	1/34976	67	1/160185	50	1/158288	51	1/224910	49	1/86040
<b>Cambios de base</b>	49	1/9053	47	1/17281	44	1/128649	39	1/107033	43	1/140693	19	1/117032
Transiciones	25 (51%)		22 (47%)		8 (18,2%)		21 (53,8%)		19 (44,2%)		3 (16%)	
Transversiones	24 (49%)		25 (53%)		36 (81,8%)		18 (46,2%)		24 (55,8%)		16 (84%)	
<b>Cambios en el marco de lectura</b>	0	<1/541516	0	<1/961658	23	1/291395	11	1/449304	8	1/895370	30	1/87758
Inserciones	0		0		2 (8,7%)		1 (9,1%)		1 (12,5%)		8 (27%)	
Deleciones	0		0		21 (91,3%)		10 (90,9%)		7 (87,5%)		22 (73%)	
<b>Homopoliméricas</b>	0	<1/280371	0		6	1/596245	6	1/439690	2	1/1911737	14	1/100380
<b>Heteropoliméricas</b>	0	<1/244881	0		17	1/183801	5	1/460840	6	1/556582	16	1/76714

El cálculo de la tasa de error se realizó mutiplicando la frecuencia de mutaciones totales por el porcentaje que representa una determinada clase de cambios (por ejemplo, cambios de base). El número obtenido se divide entre 0,6 (probalibilidad de la expresión de una nueva hebra sintetizada por *E. coli*) y entre el número total de sitios en los que dicha clase de cambios produciría un cambio fenotípico. Los números entre paréntesis muestran el porcentaje que representan las transiciones y las transversiones respecto al total de errores por cambio de base; del mismo modo se indican los porcentajes relativos a inserciones y deleciones respecto al número total de errores que producen cambios en el marco de lectura.

<sup>a</sup> Datos tomados del Alvarez *et al.* (2009).

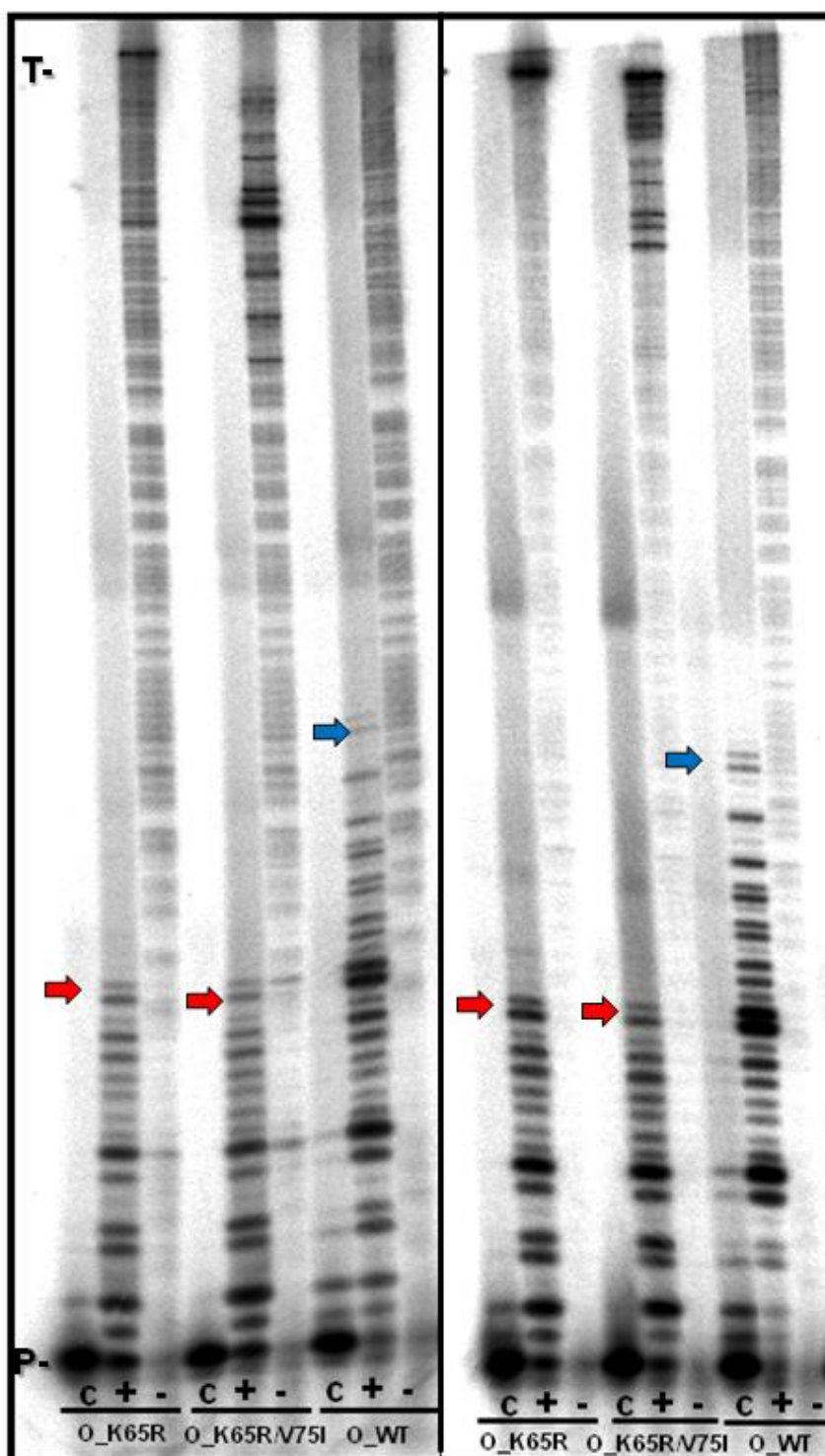
<sup>b</sup> RT del MLV comercial suministrada por Promega Corp. (nº de catálogo: M1701)

#### 4.5. Estudio de la procesividad de las enzimas de alta fidelidad

El incremento en el número de errores que producen cambios en el marco de lectura en las enzimas que muestran una mayor fidelidad, en comparación con lo observado en las enzimas con menor fidelidad de síntesis de DNA, podría estar relacionado con una interacción débil con el complejo molde-iniciador. En estudios previos se ha descrito una posible relación entre procesividad de las RTs y su tendencia a generar cambios en el marco de lectura (Bebenek *et al.*, 1989; Creighton *et al.*, 1992; Eckert y Kunkel, 1993; Bibillo y Eickbush, 2002; Gao *et al.*, 2008).

Se realizó el estudio de la procesividad de las enzimas que hasta el momento habían mostrado las mejores características en cuanto a estabilidad frente a temperaturas elevadas y fidelidad de copia (O\_K65R y O\_K65R/V75I). También se usó como control la enzima O\_WT. El ensayo se realizó utilizando el ssDNA del fago M13mp2 como molde y el iniciador Rtr174 que hibrida en la posición +191 del gen *lacZ*. De esta forma se mantuvieron las mismas condiciones que en el ensayo genético, ya que en ambos casos se utiliza como molde la misma secuencia. El resultado del ensayo de procesividad de las cuatro enzimas analizadas se muestra en la **Figura 37**.

Las tres enzimas del VIH-1 de grupo O producen fragmentos largos de DNA en ausencia de “trap”. Sin embargo, en las reacciones en las que el “trap” está presente se observan diferencias claras. En estas condiciones, la RT O\_WT es la que muestra los productos más largos y por tanto la que tiene una mayor procesividad. Las enzimas O\_K65R y O\_K65R/V75I muestran una procesividad parecida, pero menor que la de la enzima “wild type”, indicando que el cambio V75I no afecta a la procesividad mostrada por la enzima O\_K65R.



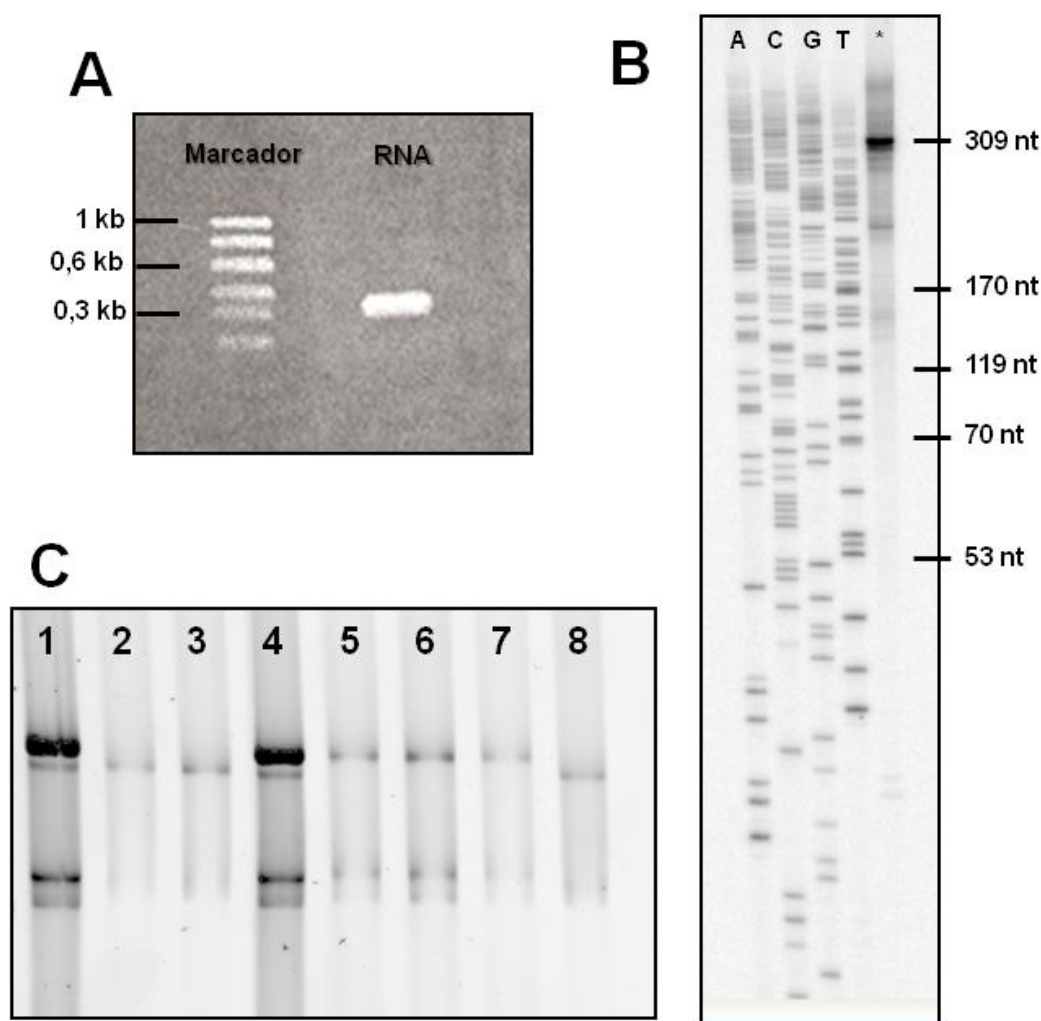
**Figura 37. Comparación de la procesividad de los mutantes del VIH-1 de grupo O y la RT O\_WT.** Los ensayos de procesividad se realizaron utilizando como molde la cadena sencilla del DNA del fago M13mp2, y un iniciador de 18 nucleótido (Rtr174). Las reacciones se realizaron a 37°C, permitiendo la extensión durante 10 (gel lado izquierdo de la figura) y 20 min (gel lado derecho de la figura). El carril C muestra la reacción control obtenida de una pre-incubación del complejo molde-iniciador con el “trap” antes de añadir la RT. Los símbolos + y – indican la presencia y ausencia del “trap” en la reacción. Las flechas azules indican la elongación conseguida con la RT O\_WT, en comparación con la de las enzimas O\_K65R y O\_K65R/V75I (flechas rojas).

#### 4.6. Determinación de la fidelidad de copia dependiente de molde RNA mediante ensayos genéticos de introducción de mutaciones

Tras el análisis de la termoestabilidad de las enzimas y el estudio de su fidelidad de copia dependiente de molde DNA analizamos la fidelidad de copia de las RTs O\_K65R y O\_K65R/V75I, utilizando como molde RNA y en el mismo contexto de secuencia que se había utilizado en el ensayo basado en la expresión de *lacZ*.

Para ello se utilizó el ensayo descrito por Boyer *et al.* (1992), en el que se realizó una adaptación del ensayo genético basado en la utilización del DNA del fago M13mp2. El promotor de la RNA polimerasa del fago T7 se insertó en el dsDNA del fago M13mp2, en el extremo 5' del gen *lacZα*. Tras la digestión del dsDNA modificado con la endonucleasa de restricción FspI, produciendo un corte en la posición +195, se realizó la transcripción utilizando la RNA polimerasa del fago T7 para sintetizar el RNA molde deseado. Se comprobó del tamaño del RNA en un gel de agarosa al 1% (**Figura 38A**), utilizando como referencia marcadores de RNA de 0,1 kb a 1 kb (el tamaño correcto del RNA ha de ser 313 nucleótidos, de la posición -118 a la +195 del gen *lacZ*). A continuación, se realizó la síntesis del cDNA catalizada por las RTs objeto del estudio. La reacción se llevó a cabo utilizando un oligonucleótido de 18 bases (Rtr174) diseñado para que pueda hibridarse con el RNA en la posición +191, en presencia de  $Mg^{2+}$  4 mM y utilizando una concentración de enzima de 100 nM y concentraciones saturantes de los cuatro dNTPs. Se comprobó que el tamaño del cDNA obtenido era correcto (309 nucleótidos, de la posición -118 a la +191 del gen *lacZ*), comparándolo con el resultado de una reacción de secuenciación ssDNA del M13mp2 realizada con la polimerasa Sequenase<sup>TM</sup> Version 2.0 (USB) y el iniciador Rtr174 (**Figura 38B**).

Finalmente se realizó una hibridación del cDNA con el “gapped DNA”, y se analizó en un gel de agarosa al 0,8%. La **Figura 38C** muestra dicho gel de agarosa, en el que se compara en el primer carril la diferencia de tamaños entre el “gapped DNA” y la forma relajada del dsDNA (RFII), que refleja la diferencia de tamaños debida a la ausencia de 407 nucleótidos en una de las hebras del “gapped DNA”. En los carriles 2-4 se muestran las reacciones de hibridación. La obtención de una sola banda en la posición esperada indica que todo el “gapped DNA” ha hibridado con copias del cDNA, por lo que estaría completo y listo para ser utilizado.



**Figura 38. Análisis de los sustratos del ensayo genético dependiente de molde RNA.** (A) Síntesis del RNA utilizado como molde en la síntesis de DNA catalizada por las RTs estudiadas. En el carril izquierdo se muestra el marcador con RNAs de distintos tamaños (0,1 kb a 1 kb). En el carril derecho aparece el RNA sintetizado con un tamaño de 313 nucleótidos. La separación de fragmentos se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1% (B) Comprobación del tamaño del cDNA. Se muestra un gel de poliacrilamida al 12% con 8 M de urea. En los cuatro primeros carriles de la izquierda se muestran las 4 reacciones de síntesis de cDNA llevadas a cabo con la polimerasa Sequenase (USB) en presencia de los correspondientes dideoxirribonucleótidos: A (ddTTP), C (ddGTP), G (ddCTP) y T (ddATP). El carril del asterisco muestra el cDNA con un tamaño de 309 nucleótidos. (C) Hibridación del cDNA y el “gapped DNA”. En un gel de agarosa al 0,8% se muestran los resultados de la hibridación del cDNA resultante de la síntesis: carriles 1 y 4: “gapped DNA” + RFII (relajada); carriles 2-3 y 8: controles de “gapped DNA” sin cDNA; carriles 5-7: reacciones de hibridación.

Se transformaron bacterias competentes *E. coli* MC1061 con el “gapped DNA” hibridado correctamente y se plaquearon en presencia de X-Gal, IPTG y un césped bacteriano de *E. coli* CSH50. La **Tabla 19** muestra las frecuencias de mutantes para cada una de las RTs analizadas usando RNA como molde en la síntesis de DNA. Las

diferencias de fidelidad entre las distintas RTs son muy pequeñas. En todas ellas se observan frecuencias de mutantes muy bajas. Las RTs mutantes O\_K65R y O\_K65R/V75I muestran mayor fidelidad que la enzima O\_WT, con valores similares a los obtenidos para las RTs de *Gammaretrovirus*, usadas como control de alta fidelidad.

**Tabla 19. Fidelidad de las RTs medida mediante ensayos genéticos.**

RT	Placas mutantes	Placas totales	Frecuencia de mutantes <sup>a</sup>
O_WT	43	12477	0,00345 (1,15)
O_K65R	54	18284	0,00295 (1,34)
O_K65R/V75I	69	23512	0,00293 (1,35)
MLV	35	13569	0,00258 (1,53)
AMV	28	11250	0,00249 (1,59)
BH10_WT	22	5559	0,00396

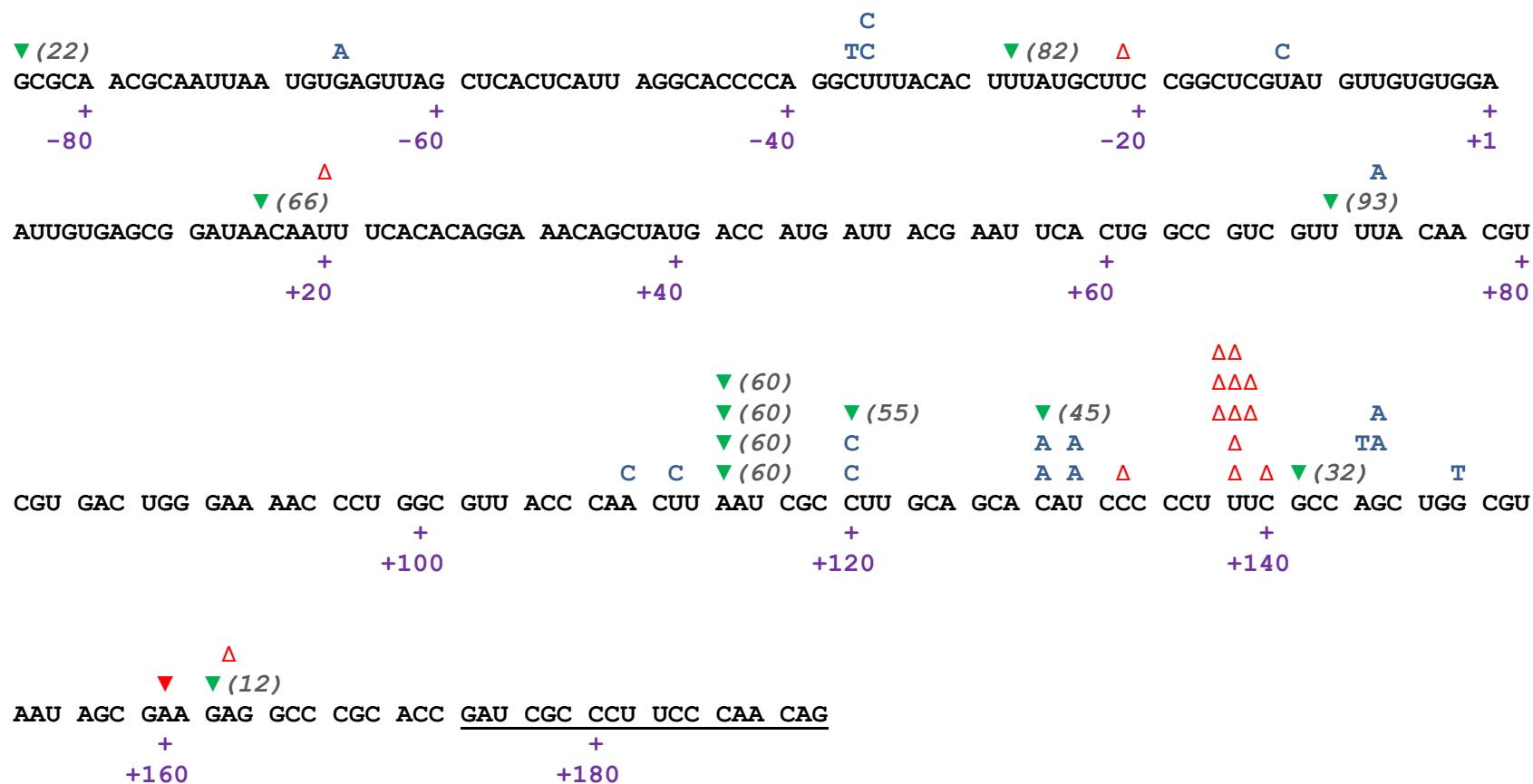
Datos obtenidos como resultado del análisis de 10-20 reacciones diferentes de síntesis de cDNA para cada enzima. Considerándose un fondo o "background" inferior a  $4,5 \times 10^{-5}$ .

<sup>a</sup> Los números entre paréntesis indican el incremento de fidelidad relativo a la observada con la RT BH10\_WT

Para determinar los tipos de errores cometidos por las distintas enzimas se realizó la secuenciación de los mutantes y a partir de las secuencias se obtuvieron los espectros de mutaciones que se muestran en las **Figuras 39-44**.

Los espectros de mutaciones muestran que todas las enzimas producen un elevado número de mutaciones, que en muchos casos generan cambios en el marco de lectura (**Tabla 20**). Estos cambios representan entre un 26% y un 50% del total, siendo las delecciones o las inserciones igual de frecuentes en todos los casos. Cabe destacar la tendencia que muestran las RTs O\_WT y O\_K65R para producir delecciones largas cuando se utiliza este tipo de molde RNA.

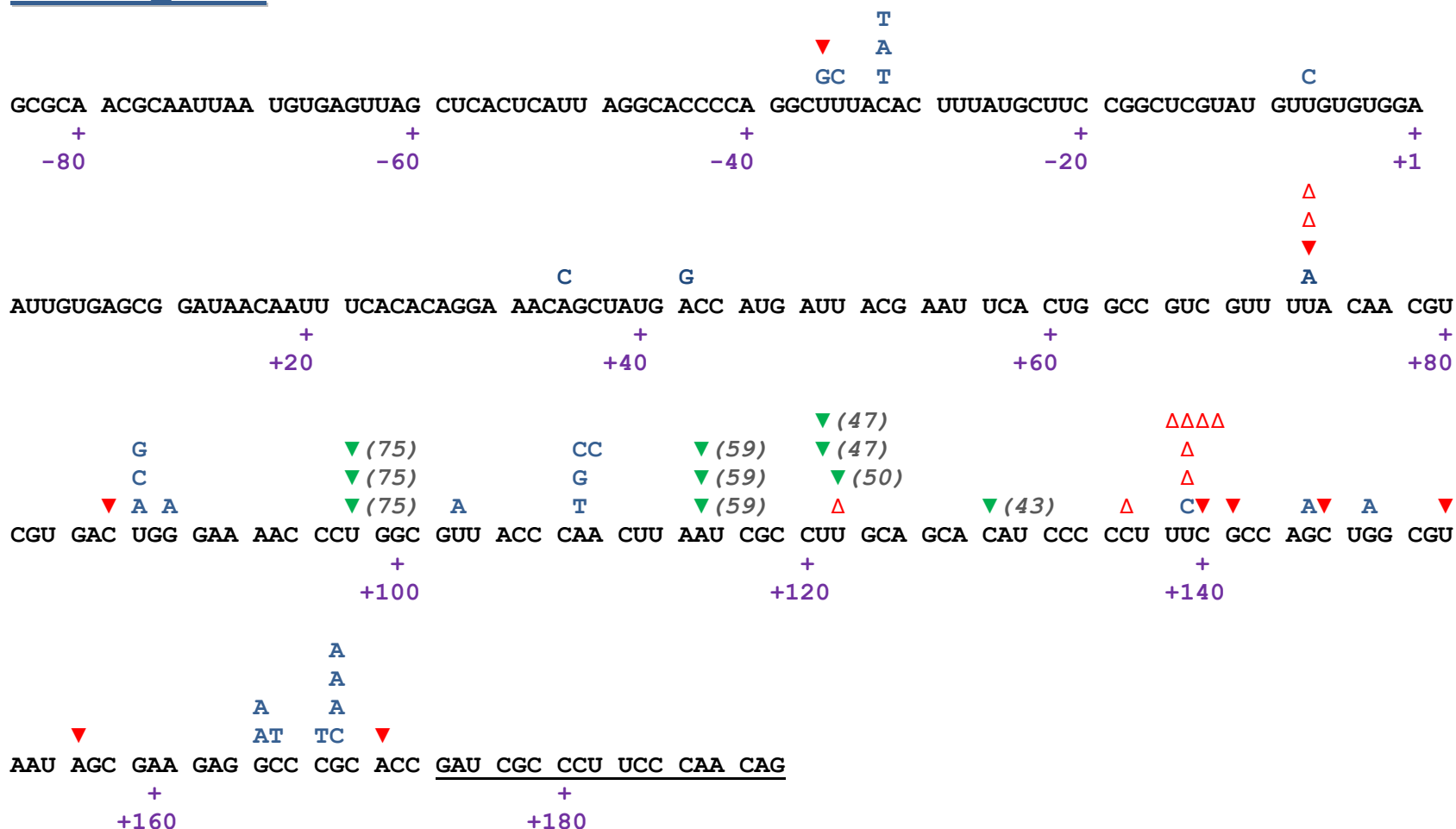
## RT de O\_WT



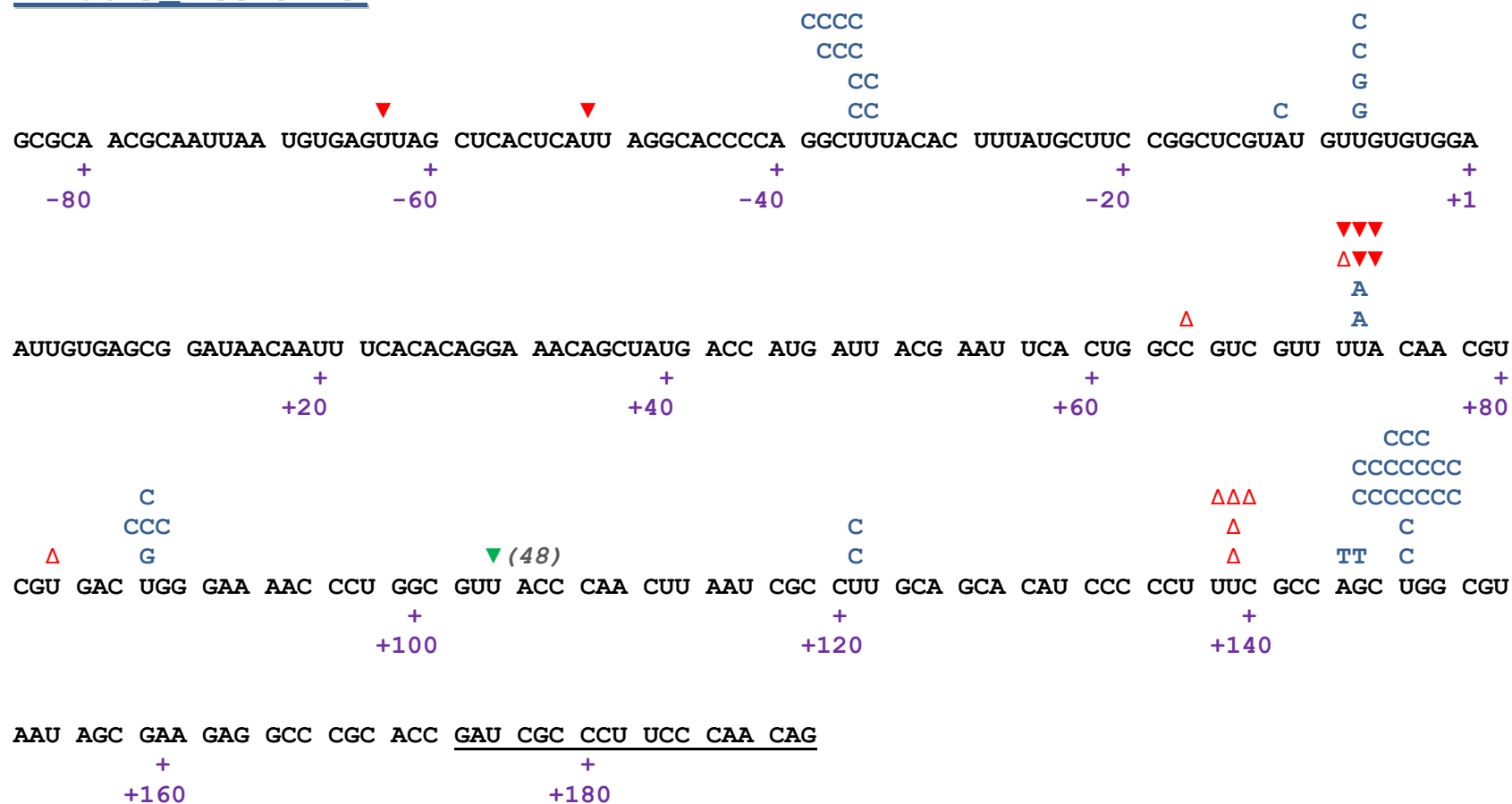
**Figura 39. Espectro de mutaciones introducidas por la RT O\_WT durante la síntesis de DNA dependiente de molde RNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo ( $\Delta$ ). Las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido ( $\blacktriangledown$ ). Las deleciones largas se muestran con el triángulo verde relleno invertido ( $\blacktriangledown$ ), indicando entre paréntesis el número de bases que se han perdido, y colocando el símbolo en la base en la que comienza la deleción. Las bases subrayadas indican la posición del iniciador en la síntesis del cDNA.



## RT de O\_K65R

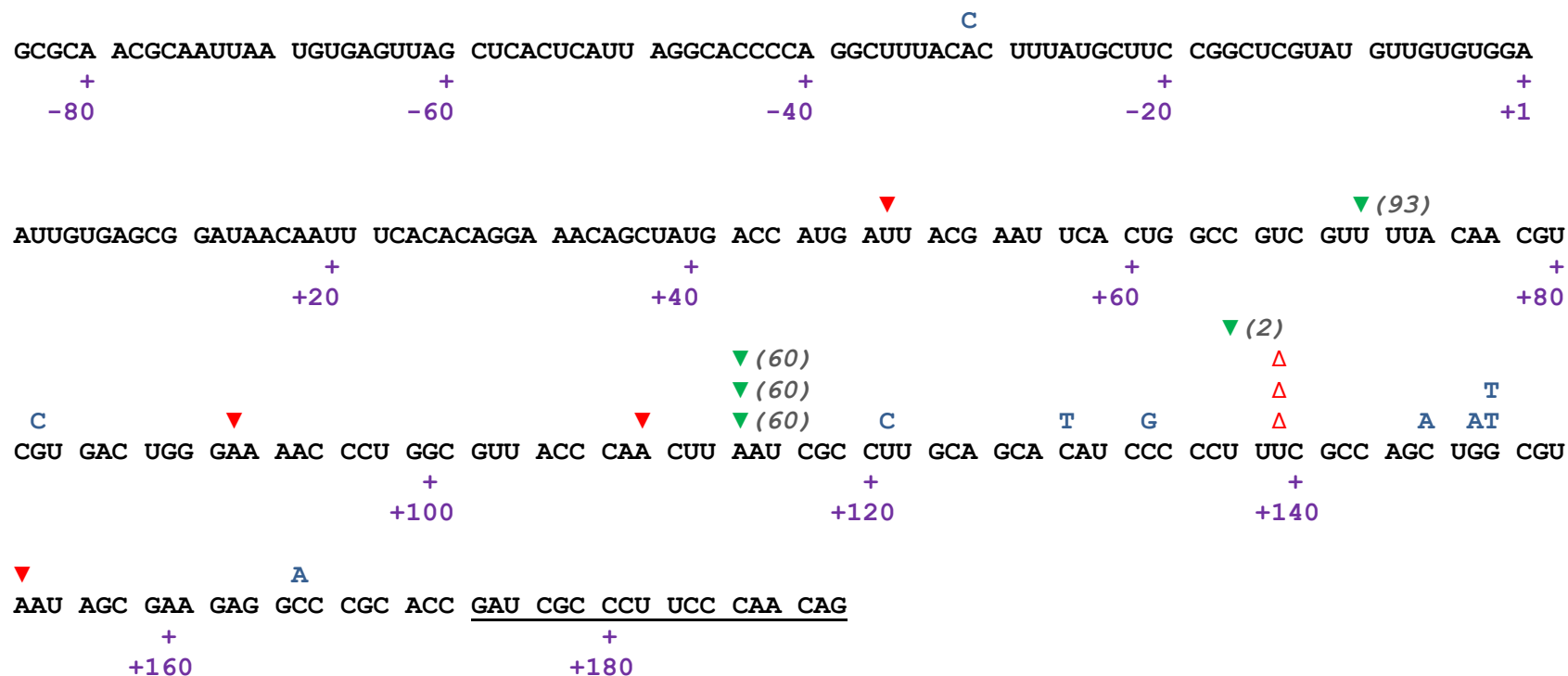


**Figura 40. Espectro de mutaciones introducidas por la RT O\_K65R durante la síntesis de DNA dependiente de molde RNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo ( $\Delta$ ). Las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido ( $\nabla$ ). Las deleciones largas se muestran con el triángulo verde relleno invertido ( $\nabla$ ), indicando entre paréntesis el número de bases que se han perdido, y colocando el símbolo en la base en la que comienza la deleción. Las bases subrayadas indican la posición del iniciador en la síntesis del cDNA.

RT de O\_K65R/V75I

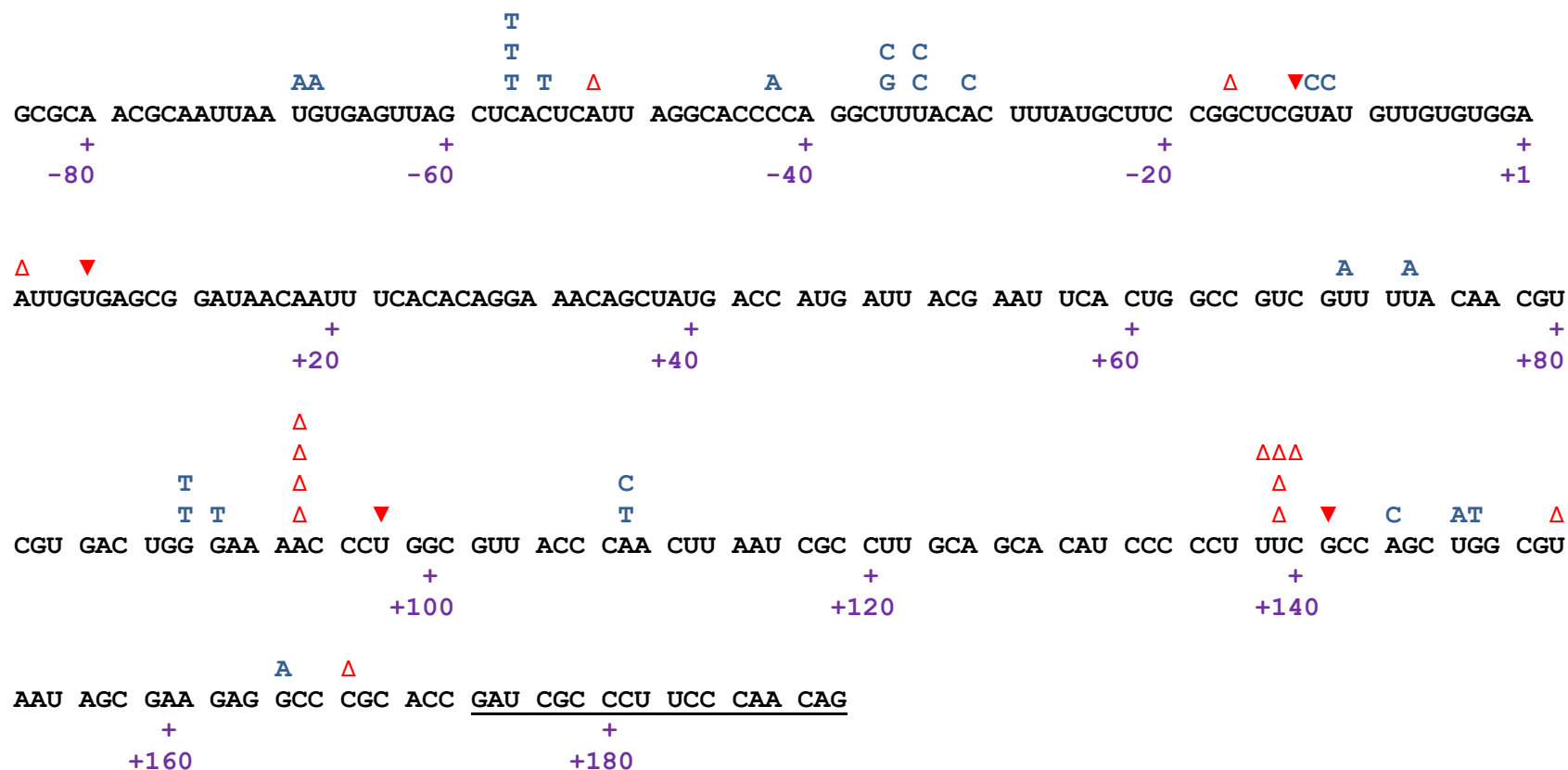
**Figura 41. Espectro de mutaciones introducidas por la RT O\_K65R/V75I durante la síntesis de DNA dependiente de molde RNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo (Δ). Las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido (▼). Las deleciones largas se muestran con el triángulo verde relleno invertido (▼), indicando entre paréntesis el número de bases que se han perdido, y colocando el símbolo en la base en la que comienza la deleción. Las bases subrayadas indican la posición del iniciador en la síntesis del cDNA.

## RT de BH10\_WT



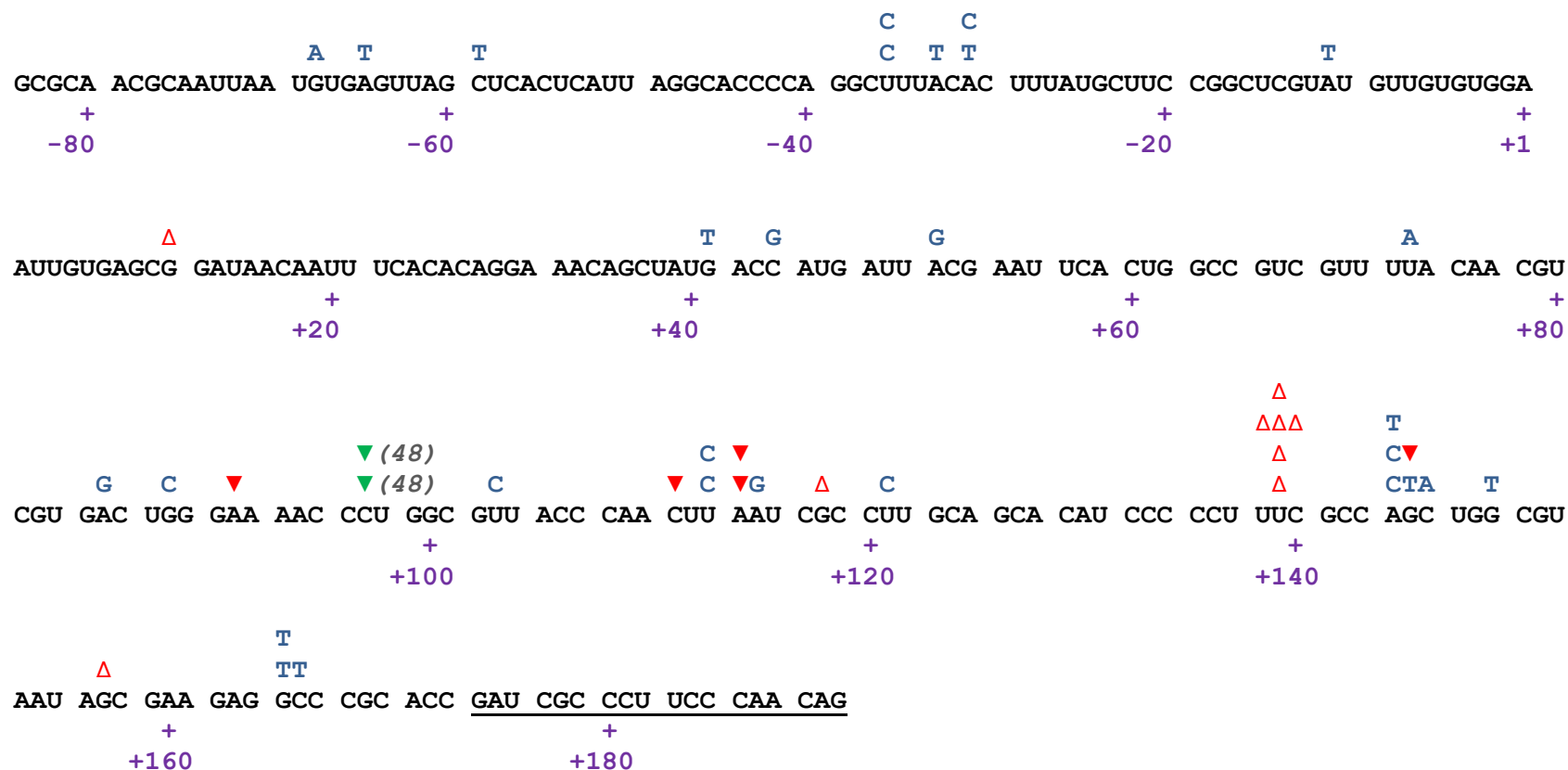
**Figura 42. Espectro de mutaciones introducidas por la RT BH10\_WT durante la síntesis de DNA dependiente de molde RNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo ( $\Delta$ ). Las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido ( $\nabla$ ). Las deleciones largas se muestran con el triángulo verde relleno invertido ( $\nabla$ ), indicando entre paréntesis el número de bases que se han perdido, y colocando el símbolo en la base en la que comienza la deleción. Las bases subrayadas indican la posición del iniciador en la síntesis del cDNA.

## RT del AMV



**Figura 43. Espectro de mutaciones introducidas por la RT del AMV durante la síntesis de DNA dependiente de molde RNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la base introducida (azul) sobre la base original del molde (en la secuencia diana del gen *lacZ*). Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo (Δ). Las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido (▼). Las bases subrayadas indican la posición del iniciador en la síntesis del cDNA.

## RT del MLV



**Figura 44. Espectro de mutaciones introducidas por la RT del MLV durante la síntesis de DNA dependiente de molde RNA.** Los cambios de base están indicados por la letra correspondiente a la nueva base (azul) sobre la base del molde de la secuencia diana del *lacZ*. Las inserciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo (Δ), las deleciones puntuales de un nucleótido se representan con el triángulo rojo relleno invertido (▼). Las deleciones largas se muestran con el triángulo verde relleno invertido (▼) indicando entre paréntesis el número de bases que se han perdido y colocando el símbolo en la base en la que comienza la deleción. Las bases subrayadas indican la posición del iniciador en la síntesis del cDNA.

**Tabla 20. Resumen de las tasas de error para cada RT en función de la clase de mutación producida durante la síntesis de DNA dependiente de molde RNA.**

Errores	O_WT		O_K65R		O_K65R/V75I		BH10_WT		AMV		MLV <sup>a</sup>	
	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error	Nº de errores	Tasa de error
<b>Todos</b>	46	1/38570	58	1/44827	62	1/53926	22	1/35931	43	1/37203	46	1/41946
<b>Cambios de base</b>	18	1/51988	29	1/47286	46	1/38335	10	1/41693	25	1/33750	29	1/35092
Transiciones	10 (56%)		18 (62%)		38 (83%)		3 (30%)		10 (40%)		13 (45%)	
Transversiones	8 (44%)		10 (38%)		8 (17%)		7 (70%)		15 (60%)		16 (55%)	
<b>Cambios en el marco de lectura</b>	28	1/39570	29	1/55987	16	1/130492	12	1/41137	18	1/55500	17	1/70878
Inserciones	13 (46%)		10 (35%)		8 (50%)		3		14 (78%)		9 (53%)	
Deleciones	15 (54%)		19 (55%)		8 (50%)		9		4 (22%)		8 (47%)	
<b>Homopoliméricas</b>	14	1/42244	11	1/78787	6	1/185745	6	1/43916	8	1/66656	9	1/71463
<b>Heteropoliméricas</b>	14	1/36896	18	1/42053	10	1/97340	6	1/38357	10	1/46575	8	1/70219

El cálculo de la tasa de error se realizó mutiplicando la frecuencia de mutaciones totales por el porcentaje que representa una determinada clase de cambios (por ejemplo, cambios de base). El número obtenido se divide entre 0,6 (probabilidad de la expresión de una nueva hebra sintetizada por *E. coli*) y entre el número total de sitios en los que dicha clase de cambios produciría un cambio fenotípico. Los números entre paréntesis muestran el porcentaje que representan las transiciones y las transversiones respecto al total de errores por cambio de base; del mismo modo se indican los porcentajes relativos a inserciones y deleciones respecto al número total de errores que producen cambios en el marco de lectura.

<sup>a</sup> RT del MLV comercial suministrada por Promega Corp. (nº de catálogo M1701).

En los ensayos de síntesis de DNA dependientes de RNA la presencia de mutaciones que producen cambios en el marco de lectura es común y muy frecuente en todas las enzimas analizadas. Todas las RTs presentan al menos un 30% de este tipo de mutaciones. Existe un cambio común a todas las RTs. Se trata de la inserción de una timidina entre las posiciones +139-+140, aunque su frecuencia varía en las distintas RTs. En las reacciones de síntesis realizadas por las RTs no se observan “hot spots” importantes de mutaciones, a excepción de las reacciones llevadas a cabo con la RT O\_K65R/V75I donde el cambio T→C da lugar a dos acumulaciones de mutaciones en las posiciones -36 y +147. En el espectro de la enzima O\_K65R se observan tres “hot spots” en las posiciones +98, +115 y +121, en las que son comunes las deleciones largas. Esta característica la comparte con las RTs BH10\_WT y O\_WT que presentan el mismo tipo de mutaciones en la posición +115, y con la enzima del MLV, en este caso en la posición +98.

En las reacciones de síntesis realizadas por las RTs de *Gammaretrovirus* se observa un equilibrio entre el número de transiciones y transversiones, mientras que en el caso de los *Lentivirus*, las enzimas del VIH-1 de grupo O producen con mayor frecuencia transiciones, y la RT del VIH-1 de grupo M subtipo B genera proporcionalmente más transversiones. En el ensayo de fidelidad de copia utilizando como molde RNA no parece que haya una relación entre la producción de cambios en el marco de lectura con la presencia de zonas homopoliméricas o heteropoliméricas en la secuencia del molde, tan solo en el caso de la RT O\_K65R podríamos evidenciar una tendencia a producir deleciones e inserciones en zonas heteropoliméricas. En este tipo de ensayo, las tasas de error más altas se obtienen con la enzima BH10\_WT. Las variantes O\_K65R y O\_K65R/V75I muestran tasas de error comparables a las obtenidas con las enzimas de oncorretrovirus.

## **5. DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Comparación de la fidelidad intrínseca de RTs de oncorretrovirus y del virus de la inmunodeficiencia humana

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se observó que la RT del VIH-1 de grupo O era capaz de sintetizar cDNA a temperaturas de hasta 68°C, mientras que la enzima del MLV no presentaba actividad DNA polimerasa a temperaturas superiores a 57°C (Álvarez *et al.*, 2009). El uso generalizado de la RT del MLV en técnicas de DNA recombinante se debe a que se trata de una enzima fácil de purificar y con una fidelidad de copia superior a la de otras RTs. La mayor fidelidad de las enzimas de virus del género *Gammaretrovirus* en comparación con las de las RTs de virus del género *Lentivirus* ha sido la limitación más importante para la utilización de estas últimas en diversas aplicaciones biotecnológicas dependiente de la síntesis de cDNA (Roberts *et al.*, 1989; Bakhanashvili y Hizi, 1992a, 1992b; Ji y Loeb, 1992; Yu y Goodman, 1992; Avidan *et al.*, 2002). En este estudio se ha realizado una comparación de la fidelidad de copia durante la síntesis de DNA de las RTs del XMRV, del MLV y de RTs de dos aislados del VIH-1 (BH10 y ESP49), procedentes de variantes filogenéticamente alejadas (BH10 es una cepa de grupo M subtipo B y ESP49 es un aislado de grupo O).

El XMRV es un *Gammaretrovirus* que se ha relacionado erróneamente con patologías humanas. Así, este oncorretrovirus se encontró en tejidos humanos de cáncer de próstata (Urisman *et al.*, 2006) y en muestras de sangre de pacientes que padecían el síndrome de fatiga crónica (Lombardi *et al.*, 2009). Aunque, esta relación fue confirmada por algunos laboratorios (Dong *et al.*, 2007; Knouf *et al.*, 2009; Schlaberg *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2010), fueron muchos los que no la observaron (Hong *et al.*, 2009; Erlwein *et al.*, 2010; Groom *et al.*, 2010; Henrich *et al.*, 2010; Switzer *et al.*, 2010; Sabuncuyan *et al.*, 2011; Satterfield *et al.*, 2011; Verhaegh *et al.*, 2011).

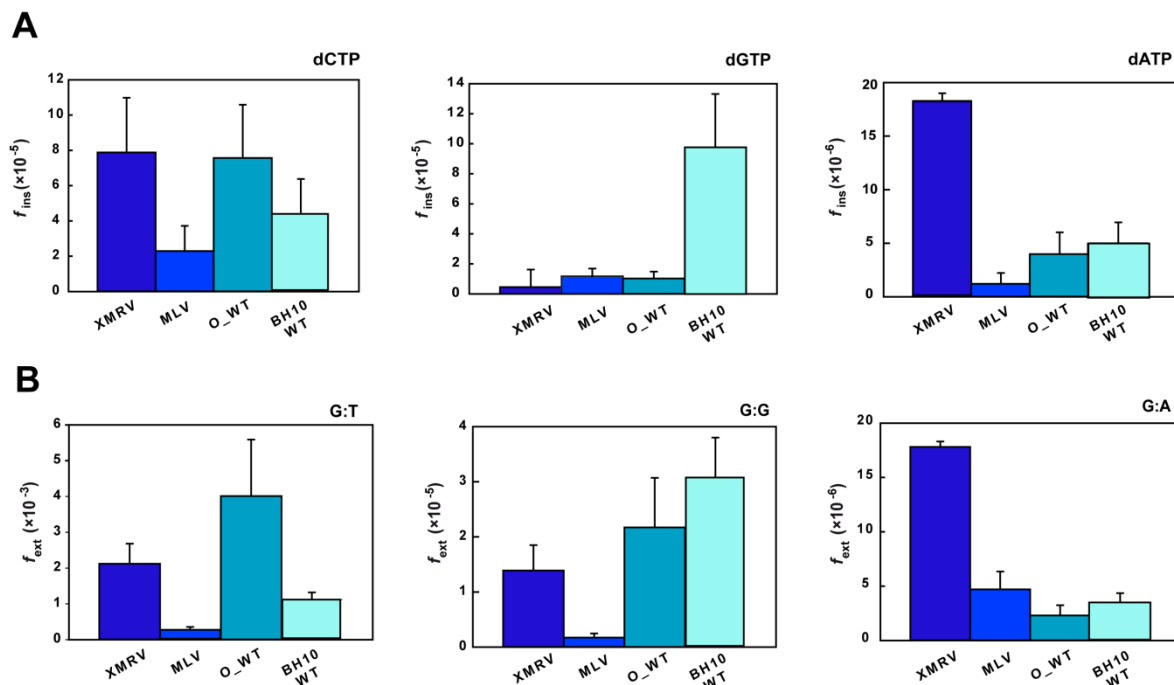
La controversia se aclaró en gran medida porque se demostró que el XMRV observado en las muestras clínicas se había formado por la recombinación de dos provirus diferentes (PreXMRV-1 y PreXMRV-2) presentes en los tumores de ratón a partir de los que se generaron las líneas celulares derivadas de cáncer de próstata (Paprotka *et al.*, 2011). El extremo 5' del genoma del XMRV deriva del provirus PreXMRV-2, mientras que su extremo 3' procede del PreXMRV-1. El sitio de recombinación está localizado en el gen *pol*, entre los nucleótidos que codifican los residuos 431-455 de la RT del XMRV. Tras este descubrimiento, se analizaron 94 cepas de ratones silvestres y ratones de

laboratorio, y solo se detectaron los dos provirus de los que proviene el XMRV en tres cepas de ratones de laboratorio (Cingöz *et al.*, 2011). Por último, se realizó un riguroso análisis de muestras de sangre de 147 pacientes con síndrome de fatiga crónica de distinta procedencia y 146 muestras de individuos sanos. El trabajo fue realizado de forma independiente por varios laboratorios, algunos de los cuales habían descrito originalmente la relación entre el virus y patologías humanas. No se observó la presencia del virus en ninguna de las muestras analizadas, resultado que finalmente zanjó la controversia (Alter *et al.*, 2012).

A pesar de que el XMRV se ha descartado como patógeno, el estudio de su RT puede ser útil para entender el proceso de la retrotranscripción y los mecanismos de inhibición y de resistencia a fármacos en retrovirus. La RT del XMRV es muy similar a la del MLV, que ha sido objeto de muchos estudios bioquímicos y estructurales (Georgiadis *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2004). El dominio DNA polimerasa de la RT del XMRV es casi idéntico al de la RT del MLV (>97,5% de identidad de secuencia), mientras que las diferencias entre ambas enzimas se concentran principalmente en sus dominios RNasa H que difieren en torno a un 10% en su secuencia de aminoácidos (Kim *et al.*, 2012; Kirby *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012) (**Figura 13**).

La comparación de las RTs del XMRV y del MLV mediante ensayos de incorporación de nucleótidos en condiciones de estado pre-estacionario demuestra que la eficiencia catalítica de la RT del XMRV en reacciones de polimerización de DNA es 8 veces menor a la que presenta la RT del MLV. Así, la RT del XMRV muestra un valor de  $k_{pol}$  de  $0,19 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ , mientras que la  $k_{pol}$  obtenida con la enzima del MLV es de  $1,55 \pm 0,17 \text{ s}^{-1}$ . Los valores de  $K_d$  obtenidos con ambas enzimas son similares y están en torno a  $24 \mu\text{M}$ , lo que nos indica que las diferencias de eficiencia catalítica entre estas RTs se deben a alteraciones en su constante de polimerización. Además, se realizó un estudio exhaustivo en el que se determinó la eficiencia de incorporación de tres nucleótidos erróneos (dCTP, dGTP y dATP frente a adenina) y la eficiencia de extensión de tres extremos desapareados (G:G, G:T y G:A). Aunque la RT del XMRV mantiene valores bajos de  $k_{pol}$  también en la incorporación de nucleótidos erróneos o en la extensión de extremos desapareados, observamos diferencias entre la fidelidad de estas enzimas debido a que varía su afinidad por el nucleótido a incorporar. La RT del XMRV muestra una eficiencia de incorporación de dGTP más baja, lo que indica una mayor selectividad que la que muestra la RT del MLV para este dNTP. Sin embargo, la fidelidad de la RT del

MLV es mayor en la incorporación de dATP y dCTP, así como para la extensión de los extremos desapareados analizados (G:G, G:T y G:A) (**Figura 45**).



**Figura 45. Comparación de la fidelidad de copia de DNA de las RTs del XMRV, del MLV y del VIH-1 (O\_WT y BH10\_WT).** (A) Eficiencias de incorporación errónea ( $f_{inc}$ ) para dCTP, dGTP y dATP frente A y (B) eficiencias de extensión de los extremos desapareados G:T, G:G y G:A, determinadas mediante cinéticas de incorporación de nucleótido llevadas a cabo en el estado pre-estacionario.

Aunque las RTs del XMRV y del MLV comparten idénticas secuencias de aminoácidos en los motivos conservados del dominio DNA polimerasa, implicados en la unión del dNTP, ambas enzimas se diferencian en sus dominios “connection” y RNasa H (**Figura 13**). Por ello, los resultados obtenidos sugieren una relación de estos dominios con el control de la fidelidad de síntesis de DNA, algo que se ha sugerido para las RTs del VIH-1 mediante el estudio de los efectos de mutaciones en los residuos conservados del dominio RNasa H (Álvarez *et al.*, 2013). Las diferencias en las secuencias de estas regiones pueden influir en el posicionamiento del complejo molde-iniciador en el sitio activo, provocando saltos en la secuencia o promoviendo deslizamientos en el molde. Por tanto, las diferencias que vemos en la eficiencia catalítica de incorporación de nucleótidos entre las RTs del XMRV y del MLV podrían ser el resultado de una unión alterada del complejo molde-iniciador.

En el caso de los *Lentivirus*, la inmensa mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo con RTs de variantes del VIH-1 clasificadas como de grupo M subtipo B, en su mayoría derivadas de los aislados identificados al comienzo de la pandemia de SIDA. Además, el VIH-1 grupo M subtipo B es responsable del mayor número de infecciones en los países desarrollados (América, Europa Occidental, Australia y Japón). Por todo ello, las RTs procedentes de estas variantes han sido las que han generado el mayor interés en cuanto a desarrollo de fármacos y estudios bioquímicos para entender las bases moleculares de su fidelidad de copia o resistencia a fármacos antirretrovirales. En esta Tesis hemos estudiado además una RT procedente de un aislado del VIH-1 grupo O (Menéndez-Arias *et al.*, 2001), previamente caracterizada en el laboratorio (denominada como O\_WT) y que poseía mayor termoestabilidad y fidelidad de copia de las RTs de grupo M subtipo B analizadas hasta el momento (Álvarez *et al.*, 2009).

Cuando se compararon mediante ensayos de incorporación de nucleótidos en condiciones de estado pre-estacionario las enzimas del XMRV, del MLV y de los dos aislados del VIH-1 observamos que la fidelidad de las RTs del XMRV y del MLV era más alta que la de las RTs de *Lentivirus*. Cabe destacar que en los ensayos cinéticos las mayores diferencias se observaron en la extensión de extremos desapareados G:G. Así, la RT del MLV presenta una  $f_{\text{ext}}$  de  $1,7 \times 10^{-5}$ , que es sensiblemente inferior a los valores obtenidos para las RTs del XMRV, BH10\_WT y O\_WT ( $1,4 \times 10^{-4}$ ,  $3,0 \times 10^{-4}$  y  $4,0 \times 10^{-4}$ , respectivamente). En el análisis de la extensión del extremo G:T, es de nuevo la RT del MLV la que muestra una fidelidad hasta 5 veces mayor a la de las otras tres enzimas (Figura 45B).

En el contexto de secuencia estudiado observamos diferencias pequeñas entre las RT O\_WT y BH10\_WT en sus eficiencias de incorporación de nucleótidos incorrectos y extensión de extremos desapareados. Tan solo en el caso de la incorporación de dGTP frente A, vemos un incremento de fidelidad de 9,5 veces en la RT O\_WT en comparación con la RT BH10\_WT (Figura 45A).

Las RTs del XMRV y BH10\_WT muestran eficiencias de extensión similares y una fidelidad menor que la de la enzima del MLV, especialmente en la incorporación de C frente a A y en la extensión de los extremos G:T y G:G. Nuestros resultados son consistentes con lo descrito previamente en estudios de fidelidad realizados con la RT del XMRV en condiciones de estado pre-estacionario. En dichos estudios se analizó la incorporación de uno de los nucleótidos incorrectos (dTTP) frente a T en un complejo heteropolimérico DNA/DNA (Ndongwe *et al.*, 2012). Los valores de  $f_{\text{inc}}$  fueron  $1,8 \times 10^{-3}$ ,

$7,3 \times 10^{-3}$  y  $4,0 \times 10^{-2}$  para las RTs del XMRV, del MLV y la RT BH10\_WT, respectivamente, lo que confirma que las RTs de *Gammaretrovirus* son más fieles en este tipo de ensayos. Además, en nuestro estudio hemos determinado que la RT del MLV es más fiel que la enzima BH10\_WT en su capacidad de discriminación entre C, G o A y T, y en la extensión de los extremos desapareados G:T y G:G (**Figura 45**).

Utilizando un complejo RNA/DNA correctamente apareado se ha demostrado que la fidelidad de la RT del MLV es mayor que la de la RT BH10\_WT. En estos estudios se observó un aumento de la fidelidad de 3,6 veces por parte de la RT del MLV cuando se compararon las eficiencias de incorporación de dGTP frente a A en ambas enzimas (Skasko *et al.*, 2005). En nuestro análisis, llevado a cabo también en el estado pre-estacionario, pero utilizando un complejo molde-iniciador DNA/DNA, el incremento que observamos es de 8,2 veces. Además, en el trabajo de Skasko *et al.* 2005, la RT del MLV también mostró una menor eficiencia de extensión del extremo G:T, que la RT del VIH-1.

Existen pocos trabajos en los que se haya analizado la fidelidad de una enzima en condiciones de estado pre-estacionario. Esto se debe a que para llevar a cabo mediciones en estas condiciones se necesita gran cantidad de enzima, especialmente si se trata de una RT con una baja eficiencia catalítica como es el caso de la del MLV. Un estudio en condiciones de estado estacionario no permite obtener constantes catalíticas precisas, ya que los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  están influidos por la disociación de la RT del complejo molde-iniciador y no son equivalentes a la  $k_{pol}$  y  $K_d$  que reflejan los parámetros de afinidad y polimerización de la enzima. Sin embargo, estos estudios aportan datos valiosos con los que comparar enzimas estudiadas en las mismas condiciones, ya que los valores de selectividad de los distintos nucleótidos son similares en condiciones de estado estacionario y pre-estacionario.

En análisis realizados en condiciones de estado estacionario se había observado que la RT del MLV mostraba menor eficiencia en la incorporación de nucleótidos erróneos, y en la extensión de extremos desapareados que la enzima BH10\_WT (Bakhanashvili y Hizi, 1992a). Tras un estudio de la eficiencia de las enzimas en la incorporación de dATP, dCTP y dGTP frente adenina, y de la eficiencia de extensión de los extremos generados tras dichas incorporaciones erróneas (A:A, A:C y A:G) se observó que la fidelidad de la RT del MLV era entre 10 y 100 veces superior a la de la RT BH10\_WT. Aunque realizado en condiciones de estado estacionario, las diferencias observadas en este trabajo son consistentes con los resultados obtenidos en esta Tesis, ya que nosotros también constatamos grandes diferencias en las eficiencias de

incorporación de nucleótidos incorrectos y en la extensión de extremos desapareados entre las RTs del MLV y de la cepa BH10 del VIH-1.

Los parámetros cinéticos dependen enormemente de la secuencia del complejo molde-iniciador utilizado en el ensayo (Richetti y Buc, 1990). Por ello, los ensayos genéticos basados en la expresión de un gen marcador pueden dar mejores estimaciones de las diferencias de fidelidad entre distintas enzimas, ya que permiten un análisis de mutaciones en un gran número de contextos de secuencia diferentes. La frecuencia de mutantes obtenida en este tipo de ensayos para las RTs del XMRV y del MLV fueron similares a las estimadas previamente para las RTs de otros oncorretrovirus como el AMV (Roberts *et al.*, 1988, 1989; revisado en Menéndez-Arias, 2009). En los ensayos basados en la detección de mutantes en la expresión del gen *lacZ* se observó que la fidelidad de las RTs de los *Gammaretrovirus* (XMRV y MLV) era 13-15 veces superior a la de la RT BH10\_WT, y entre 5 y 6 veces superior a la de la enzima O\_WT.

La RT BH10\_WT y otras filogenéticamente relacionadas tienden a producir mutaciones que producen cambios en el marco de lectura en zonas homopoliméricas de la secuencia del molde (Abbotts *et al.*, 1993; Bebenek *et al.*, 1993; Rezende *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 1999; Boyer y Hughes, 2000; Boyer *et al.*, 2007). El resultado de nuestro análisis indica que más de un 90% de las inserciones y deleciones generadas por la RT BH10\_WT ocurren en estas zonas, probablemente debido a un apareamiento incorrecto entre el molde y el iniciador. Sin embargo, la RT O\_WT apenas produce errores que alteran el marco de lectura. Si comparamos los espectros de mutación generados por las RTs del XMRV y del MLV vemos diferencias importantes, como por ejemplo, una mayor tendencia de la enzima del MLV a producir deleciones largas e inserciones de un único nucleótido. Otra diferencia entre las dos enzimas de *Gammaretrovirus* afecta a la distribución de los cambios en zonas homopoliméricas y heteropoliméricas de la secuencia del molde. La RT del XMRV produce inserciones o deleciones en regiones homopoliméricas con una frecuencia 4,4 veces menor que en secuencias heteropoliméricas. Sin embargo, la distribución de errores es similar entre ambos tipos de secuencia cuando la reacción de polimerización es catalizada por la RT del MLV. Los resultados obtenidos para la enzima del XMRV muestran una distribución de mutaciones muy similar a la descrita para la RT del AMV, obteniéndose cambios de base en la posición -66 y entre las posiciones +144 y +149, y deleciones de un solo nucleótido en la posición +169 (Roberts *et al.*, 1989).

En el estudio de fidelidad realizado en esta Tesis cabe destacar la elevada capacidad de todas las RTs para incorporar C frente a A, lo que daría lugar a la aparición en la secuencia de un extremo desapareado C:A. En el ensayo genético, la fijación de este tipo de desapareamiento daría lugar a errores del tipo C→T, frecuentes en los espectros de mutaciones obtenidos para todas las RTs. Por otro lado, el análisis de las eficiencias de extensión de extremos desapareados de todas las RTs revelan que las más eficientes afectan a extremos G:T. En el ensayo genético observamos que el cambio T→C (errores producidos por la extensión del extremo G:T) es el error más frecuente. La RT O\_WT es la que muestra un mayor porcentaje de este tipo de cambios, que representan un 41% del total de errores en su espectro de mutaciones. Además, es esta enzima la que muestra la eficiencia más alta en la extensión del extremo desapareado G:T.

La escasa capacidad para extender extremos G:A por parte de la mayoría de las RTs se tradujo en el análisis genético en la aparición de pocos cambios G→T, que en este caso representan menos de 1% de las mutaciones observadas en el espectro de mutaciones. La RT del XMRV es la que extiende más eficientemente el extremo G:A, y al mismo tiempo en el análisis de su espectro de mutaciones es donde encontramos la mayor proporción de cambios G→T.

## 5.2. Sustitución de aminoácidos en la RT del VIH-1 de grupo O y sus efectos sobre fidelidad y termoestabilidad

Estudios mutacionales llevados a cabo con RTs del VIH-1 grupo M subtipo B han permitido identificar sustituciones de aminoácido que producen un incremento significativo de la fidelidad de síntesis de DNA. Sin embargo, la mayoría de estos cambios producen un efecto negativo sobre la actividad polimerasa de la enzima (**Tabla 21**). Por ejemplo, la sustitución en la posición 61 de Phe por Ala produce un incremento de fidelidad de 11,7 veces. Sin embargo, también produce una disminución de la procesividad y de la afinidad por el complejo molde-iniciador (Mandal *et al.*, 2006; Agopian *et al.*, 2007). Por otro lado, RTs mutantes con los cambios V148I o Q151N muestran incrementos de fidelidad de 8,7 y 13,1 veces en comparación con la enzima “wild-type”, aunque sus eficiencias catalíticas de incorporación de nucleótidos son hasta 23 veces más bajas que las que muestra la RT WT en condiciones de estado pre-estacionario (Weiss *et al.*, 2000, 2002, 2004). Los cambios de aminoácido K65R, V75I y R78A introducidos en el contexto de secuencia de la RT del VIH-1 grupo M subtipo B

fueron los que produjeron el mayor incremento en la fidelidad de copia sin alterar la actividad DNA polimerasa de la enzima.

**Tabla 21. Mutaciones en la RT del VIH-1 grupo M subtipo B que producen un aumento de fidelidad determinado por el ensayo genético basado en la expresión del gen *lacZ*.**

Mutación	Composición de las subunidades de la RT <sup>a</sup>	Incremento en la fidelidad de copia <sup>b</sup>	Referencia	Inconvenientes de la mutación	Referencias
<b>F61A</b>	p66/p51 <sup>WT</sup> (HXB2)	11,7	Fisher y Prasad, (2002)	Baja procesividad Baja afinidad por el complejo molde-iniciador	Mandal <i>et al.</i> (2006) Agopian <i>et al.</i> (2007) Silverman <i>et al.</i> (2008)
<b>K65R</b>	p66/p51 (HXB2)	8,1	Shah <i>et al.</i> (2000)		
<b>L74V</b>	p66/p66 (BH10)	1,7	Shah <i>et al.</i> (2000)	Baja procesividad	Upadhyay <i>et al.</i> (2010)
	p66/p51 <sup>WT</sup> (BH10)	3,5	Jonckheere <i>et al.</i> (2000)		
<b>V75I</b>	p66/p51 (BH10)	3,0	Matamoros <i>et al.</i> (2008)		
<b>D76V</b>	p66/p51 (BH10)	8,8	Kim <i>et al.</i> (1998)	Baja procesividad	Kim <i>et al.</i> (1999)
<b>R78A</b>	p66/p51 (BH10)	8,9	Kim <i>et al.</i> (1999)		
<b>E89G</b>	p66/p51 <sup>WT</sup> (HXB2)	1,4	Jonckheere <i>et al.</i> (2000)		
	p66/p51 <sup>WT</sup> (BH10)	2,0			
<b>V148I</b>	p66/p66 (HXB2)	8,7	Weiss <i>et al.</i> (2004)	Disminuye la afinidad por el dNTP correcto	Operario <i>et al.</i> (2006)
<b>Q151N</b>	p66/p51 (BH10)	13,1	Weiss <i>et al.</i> (2000)	Baja procesividad Baja eficiencia de incorporación del dNTP correcto	Weiss <i>et al.</i> (2000)
<b>M184I</b>	p66/p51 (HXB2)	4,0	Rezende <i>et al.</i> (1998)	Baja procesividad Baja eficiencia de incorporación del dNTP correcto	Feng y Anderson (1999) Cramer <i>et al.</i> (2002)

<sup>a</sup> Se muestra la composición de las RTs utilizadas en cada caso: homodímeros (p66/p66) o heterodímeros (p66/p51). El superíndice WT indica que la subunidad correspondiente tiene secuencia "wild-type". Entre paréntesis se señala la cepa correspondiente del VIH-1 grupo M subtipo B de la que deriva la RT estudiada.

<sup>b</sup> Incremento de fidelidad mostrado por la enzima mutante en comparación con la RT "wild type" del aislado o clon correspondiente.



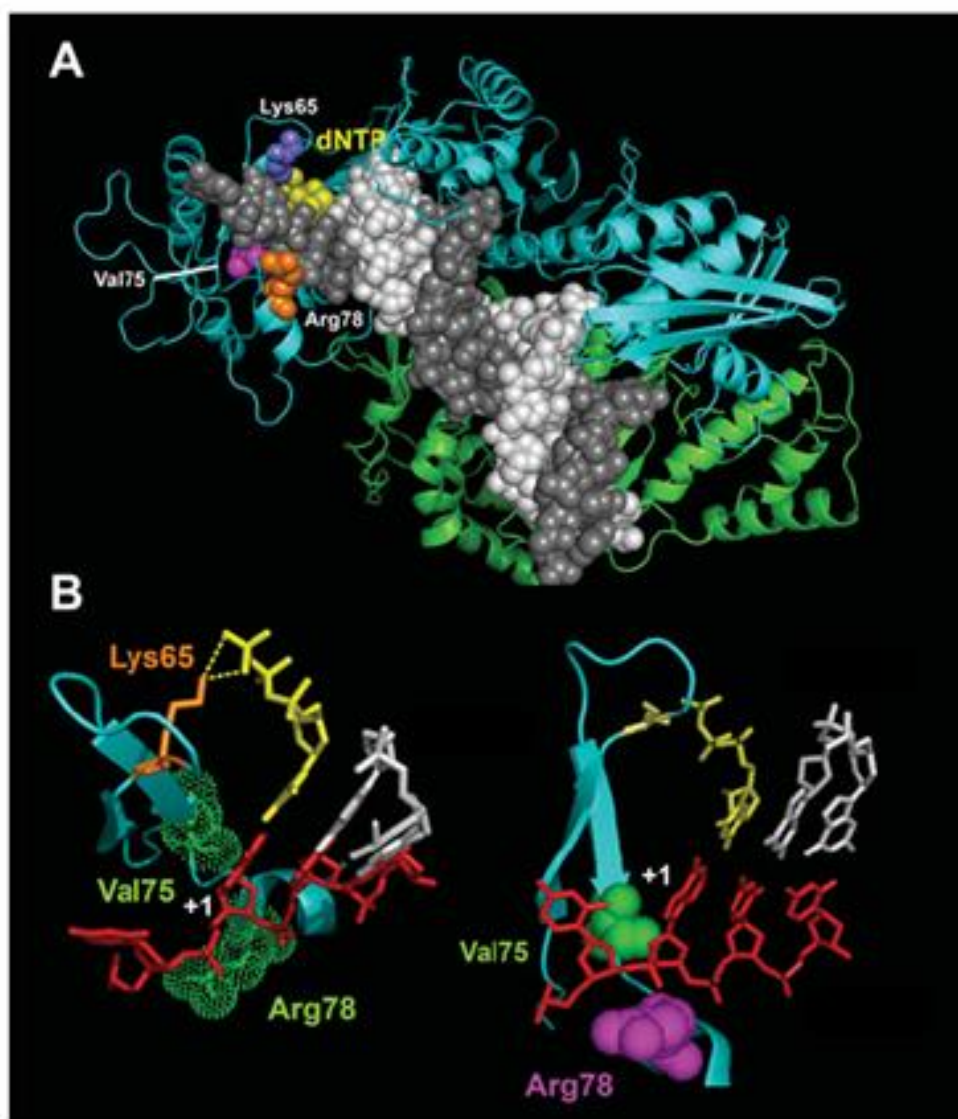
### 5.2.1. Efecto de los cambios K65R, V75I y R78A sobre la estabilidad de la RT del VIH-1 grupo O a altas temperaturas

Los resultados obtenidos demuestran que las RTs de lentivirus (BH10\_WT y O\_WT) y sus derivados (O\_K65R y O\_K65R/V75I) son activas en reacciones de retrotranscripción realizadas a altas temperaturas. En concreto, las reacciones de retrotranscripción catalizadas por las RTs O\_WT, O\_K65R y O\_K65R/V75I se pueden efectuar a temperaturas por encima de los 65°C. El cambio V75I reduce muy ligeramente la eficiencia de la retrotranscripción a altas temperaturas en comparación con la enzima O\_WT (Álvarez *et al.*, 2009). Sin embargo, en presencia del cambio K65R este efecto resulta indetectable, ya que la enzima con la doble mutación muestra una termoestabilidad similar a la descrita para la RT O\_K65R. Aunque puede parecer moderado, este incremento de temperatura podría solventar algunos problemas derivados de paradas en la síntesis de DNA y debidos a la presencia de estructuras secundarias en el RNA.

Por otro lado, la sustitución de la Arg78 por una Ala tiene un efecto claramente desestabilizador de la enzima. Este efecto, observado en las RTs O\_R78A y O\_V75I/R78A podría ser el resultado de una pérdida de interacciones (especialmente de puentes de hidrógeno) entre la cadena lateral de Arg78 y otros residuos cercanos que podrían afectar a la estabilidad de la interacción entre las subunidades de la RT. El residuo de la posición 78 ejerce una fuerte influencia en la conformación de la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  e interacciona con el molde en la posición +1, por lo que cambios que afectan a este aminoácido podrían justificar la baja eficacia catalítica de la enzima (**Figura 46**).

La actividad DNA polimerasa dependiente de RNA a 37°C fue aproximadamente 3 veces menor para el doble mutante O\_V75I/R78A que para la RT O\_WT. Las dos enzimas mutantes portadoras del cambio R78A presentan una eficacia catalítica muy baja a temperaturas superiores a 52°C tal como se demuestra en reacciones de RT-PCR. Por ello, su desarrollo como enzimas termoestables de alta fidelidad queda muy limitado.

En los análisis de actividad residual tras pre-incubaciones a temperaturas elevadas son de nuevo las enzimas de grupo O (O\_WT, O\_K65R y O\_K65R/V75I) las que mantienen su actividad a las temperaturas más altas del estudio (**Figura 26**). Se observa que tras pre-incubar a 54°C durante 5 min las RTs RT BH10\_WT y del MLV retienen solamente un 3% y un 6%, respectivamente, de su actividad a 37°C. Sin embargo, la enzima O\_WT y las variantes que portan la Arg en la posición 65 retienen tras la pre-incubación a 54°C, alrededor de un 25% de su actividad a 37°C.



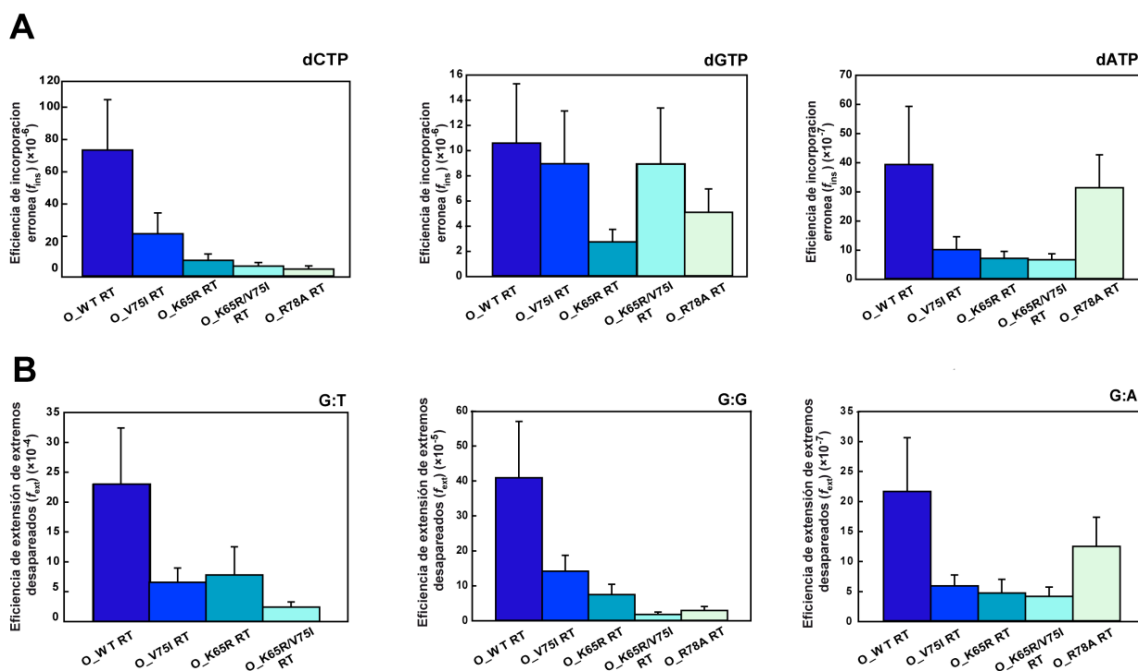
**Figura 46.** Estructura de la RT del VIH-1 formando un complejo con un molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico y con el dNTP entrante (PDB 1RTD). **(A)** Complejo ternario de la RT del VIH-1, dsDNA y dTTP. Las subunidades p66 y p51 de la RT están representadas en azul claro y verde, respectivamente. El complejo molde-iniciador se representa por cadenas de esferas grises (molde) y blancas (iniciador). El dTTP entrante aparece en amarillo. Las cadenas laterales de Lys65, Val75 y Arg78 están representadas en azul, magenta y naranja, respectivamente. **(B)** Se muestran dos vistas de la horquilla  $\beta 3\text{-}\beta 4$  y el sitio de unión del dNTP con los residuos seleccionados.

### 5.2.2. Fidelidad de síntesis de DNA dependiente de molde DNA (ensayos cinéticos y ensayos basados en la expresión del gen *lacZ*)

La interacción entre la cadena lateral de la Lys65 y el fosfato gamma del dNTP es importante en la estabilización del dNTP entrante en el sitio activo de la RT (**Figura 46**) (Huang *et al.*, 1998). K65R confiere resistencia a inhibidores didesoxirribonucleótidos y a tenofovir, lo que está relacionado con una reducción en la velocidad de inserción ( $k_{pol}$ ) de los análogos a nucleótido (Sluis-Cremer *et al.*, 2000; Deval *et al.*, 2004; Sluis-Cremer *et*

*al.*, 2007; revisado en Menéndez-Arias, 2008). Además, estudios bioquímicos realizados con la RT del aislado HXB2, clasificado dentro del grupo M subtipo B, demuestran que K65R disminuye la eficiencia de incorporación de nucleótidos incorrectos al disminuir su valor de  $k_{pol}$  (Garforth *et al.*, 2010). En este trabajo, los autores determinaron eficiencias de incorporación para nucleótidos incorrectos (dTTP, dCTP y dGTP), observando que el incremento de fidelidad está relacionado con un descenso en la  $k_{pol}$ , que es mayor en el caso de los nucleótidos incorrectos. Este descenso puede deberse a cambios en la interacción con el dNTP entrante, debidos a una restricción estructural impuesta por la Arg72, residuo que interacciona con el fosfato  $\beta$  del dNTP entrante y que podría interaccionar también con la Arg65 (Das *et al.*, 2009).

Nuestros estudios con la RT del VIH-1 de grupo O proporcionan resultados consistentes con los publicados para la RT de grupo M subtipo B (Garforth *et al.*, 2010). Así, se observó que la mutación K65R producía una disminución en la constante de polimerización,  $k_{pol}$ , y una reducción entre 4 y 8 veces de las eficiencias de incorporación de nucleótidos incorrectos en comparación con la RT no mutada (**Figura 47A**).



**Figura 47. Comparación de la fidelidad de copia durante la síntesis de DNA de las variantes de la RT del VIH-1 de grupo O. (A)** Eficiencias de incorporación errónea ( $f_{inc}$ ) para dCTP, dGTP y dATP frente A y **(B)** eficiencias de extensión de los extremos desapareados G:T, G:G y G:A, determinadas mediante ensayos cinéticos llevados a cabo en condiciones de estado pre-estacionario.

Ensayos basados en la expresión del gen *lacZ* demuestran que en la RT del VIH-1 de grupo O, la sustitución K65R produce cambios de fidelidad similares a los descritos anteriormente para RTs del VIH-1 grupo M subtipo B. Así, la presencia de este cambio en la RT de subtipo B produce un incremento de fidelidad de 8,1 veces respecto a su enzima “wild type” (RT del aislado HXB2) (Shah *et al.*, 2000). En la RT de grupo O, la presencia del cambio K65R mantiene el incremento de fidelidad observado en la enzima de subtipo B. La RT O\_K65R muestra una fidelidad entre 9,4 y 10,8 veces superior a la de la enzima “wild type”. En las enzimas portadoras del cambio K65R en grupo M subtipo B y en grupo O, encontramos muchas características compartidas en sus espectros de mutaciones. Por ejemplo, ambas muestran un incremento en la proporción de transversiones frente al número de transiciones respecto a la RT “wild type”.

La mutación K65R en el contexto de secuencia del subtipo B (aislado HXB2) incrementa el número de errores que provocan cambios en el marco de lectura y muestra una clara propensión a producir deleciones en zonas homopoliméricas de la secuencia del molde (Shah *et al.*, 2000). En el contexto de secuencia de grupo O, este aumento en la producción de inserciones y deleciones debido a la presencia del cambio K65R sigue siendo evidente. En las reacciones de síntesis catalizadas por la enzima O\_K65R encontramos que de entre todos los tipos de errores observados un 2% son inserciones y un 31% deleciones. Por el contrario, en las reacciones llevadas a cabo con la RT O\_WT no aparecen estos tipos de cambios. A diferencia de lo descrito para RTs de subtipo B, la enzima O\_K65R tiende a producir deleciones e inserciones en zonas heteropoliméricas de la secuencia del molde.

Los residuos Val75 y Arg78 están localizados en la base de la horquilla  $\beta 3\text{-}\beta 4$  (formada por los residuos comprendidos entre el 64 y el 77). Esta zona contiene varios residuos implicados en la interacción con el dNTP entrante y, por tanto, son muy importantes en la resistencia a fármacos antirretrovirales y en la fidelidad de copia de DNA (Huang *et al.*, 1998; revisado en Menéndez-Arias, 2008). En la subunidad p66 de la RT del VIH-1, ambos aminoácidos interaccionan con el molde en la posición +1 (**Figura 46**). Anteriormente se había demostrado que en el contexto de secuencia del VIH-1 de grupo M subtipo B (aislado BH10), el cambio V75I producía un aumento de fidelidad de 3,5 veces (Matamoros *et al.*, 2008). Por otro lado, el mutante O\_V75I tenía una fidelidad 1,9 veces superior a la de la enzima O\_WT (Álvarez *et al.*, 2009). Analizando el espectro de mutaciones obtenido en el ensayo basado en la expresión del gen *lacZ* se observó

que la distribución y tipo de errores producidos fue muy similar para las reacciones catalizadas por las RTs O\_V75I y O\_WT (Álvarez *et al.*, 2009).

En el caso de la Arg78, existen evidencias que indican que la introducción de la mutación R78A en el contexto de secuencia de subtipo B produce un gran incremento en la fidelidad de copia determinada por ensayos genéticos (Kim *et al.*, 1999), aunque no se han publicado espectros de mutaciones para esta enzima. En nuestro análisis con la RT O\_R78A obtenemos una tasa de error de  $4,4 \times 10^{-6}$ , que es 13,1 veces menor a la observada para la enzima O\_WT. El espectro de mutaciones de la enzima O\_R78A comparte algunos “hot spots” con O\_V75I y O\_WT (en las posiciones -34 y -36), muestra proporciones similares de transversiones y transiciones, y tiene una baja frecuencia de deleciones e inserciones. La alta fidelidad mostrada por R78A se confirmó con ensayos bioquímicos, ya que muestra una eficiencia en la incorporación de dCTP frente a A de  $4,3 \times 10^{-6}$ , que es 17,7 veces inferior a la obtenida con la enzima O\_WT. También se observa que produce un incremento de fidelidad en la extensión de complejos desapareados G:T y G:G, cuyas eficiencias de extensión son hasta 14 veces más bajas que las que muestra la RT O\_WT (**Figura 47**).

En el análisis de la enzima que combina los cambios K65R y V75I se obtuvieron tasas de error muy similares a las obtenidas con la RT portadora del cambio K65R, con valores de  $6,3 \times 10^{-6}$  para la RT O\_K65R/V75I y  $6,2 \times 10^{-6}$  para O\_K65R. Ambas enzimas mostraron niveles de fidelidad considerablemente superiores a los de la RT O\_WT, cuya tasa de error está descrita en torno a  $5,8 \times 10^{-5}$ . A pesar de tener una fidelidad parecida, los espectros de mutaciones de las variantes O\_K65R y O\_K65R/V75I son claramente diferentes. Esto podría justificarse, en algunos casos, debido a diferencias en sus eficiencias catalíticas para la incorporación errónea o la extensión de extremos desapareados. Por ejemplo, O\_K65R muestra una eficiencia en la incorporación de dCTP de  $9,5 \times 10^{-6}$ , superior a la del doble mutante que muestra una eficiencia de  $6,1 \times 10^{-6}$ . Sin embargo, la incorporación de dGTP frente a una adenosina es tres veces más eficiente en las reacciones catalizadas por la RT O\_K65R/V75I (**Figura 47A**).

La RT O\_K65R muestra una gran tendencia a producir deleciones o inserciones y a producir más transversiones que transiciones. Sin embargo, esta especificidad de errores cambia cuando se introduce el cambio V75I. El doble mutante O\_K65R/V75I muestra “hot spots” en posiciones comunes a la RT O\_V75I (por ejemplo, -34, -35, -36 y +87). Sin embargo, no se observa la acumulación de cambios en estas posiciones cuando la reacción de síntesis es catalizada por la RT O\_K65R. Estos resultados pueden

indicar una interacción funcional de ambas mutaciones (K65R y V75I) dentro del contexto de secuencia de la RT de grupo O (efecto epistático), ya que no se observa dominancia de uno de los cambios. Más evidencias de esta interacción epistática se obtuvieron de los ensayos bioquímicos, en los que se observa que el doble mutante muestra características de ambas enzimas. La eficiencia de incorporación del nucleótido incorrecto dGTP en el doble mutante es igual a la descrita para la enzima O\_V75I, mientras que las eficiencias para los otros dos nucleótidos incorrectos son las propias de la enzima O\_K65R.

En los ensayos bioquímicos de eficiencia de extensión de extremos desapareados, la variante portadora de ambos cambios mostró niveles de fidelidad más altos que las enzimas O\_V75I y O\_K65R. Por ejemplo, la eficiencia de extensión del extremo G:G por la RT O\_K65R/V75I es de  $1,8 \times 10^{-5}$ , mientras que los valores obtenidos con los mutantes sencillos fueron  $7,3 \times 10^{-5}$  y  $1,4 \times 10^{-4}$  para las RTs O\_K65R y V75I, respectivamente. A diferencia de lo que ocurre en la enzima O\_K65R, la pérdida de afinidad por el nucleótido (incremento de la  $K_d$ ) tiene un importante papel en el incremento de fidelidad mostrado por la enzima O\_V75I. El incremento de fidelidad de O\_K65R/V75I, especialmente marcado en la extensión de los complejos desapareados G:T y G:G, se debe a una alteración de la  $K_d$  en el caso de la extensión de G:T, y a cambios en ambos parámetros ( $k_{pol}$  y  $K_d$ ) en la extensión de G:G (**Figura 47**).

### 5.2.3. Fidelidad de síntesis de DNA dependiente de molde RNA

La retrotranscripción o replicación del VIH-1 incluye dos etapas de síntesis de DNA, una dependiente de RNA (síntesis de la cadena negativa de DNA) y otra dependiente de DNA (síntesis de la cadena positiva de DNA). Los errores cometidos por la RT a lo largo de las dos etapas contribuyen a la frecuencia de mutación observada para cada ciclo de replicación.

Para analizar la fidelidad de copia dependiente de RNA hemos utilizado una adaptación del ensayo genético basada en la expresión del gen *lacZ*, en la que utilizamos una molécula de RNA sintetizada *in vitro* que servirá de molde para la reacción de síntesis. Estos ensayos son relativamente complejos (Boyer *et al.*, 1992). En este trabajo hemos comparado la fidelidad de síntesis de DNA dependiente de RNA de varias RTs. Al igual que observamos en los ensayos en los que se usó molde DNA, las tasas de error obtenidas fueron más bajas para las RTs O\_K65R y O\_K65R/V75I que para la enzima O\_WT, aunque las diferencias fueron mucho menores. Estos datos confirman la mayor fidelidad de las RTs mutantes respecto a la enzima “wild type”. Las tasas de error

obtenidas fueron  $2,2 \times 10^{-5}$  y  $1,8 \times 10^{-5}$  para las RTs O\_K65R y O\_K65R/V75I, respectivamente, valores muy similares e incluso inferiores a los obtenidos con enzimas de oncorretrovirus (Tabla 22). La tasa de error de la RT del AMV fue  $2,7 \times 10^{-5}$ , algo superior a la de la RT del MLV que fue de  $2,4 \times 10^{-5}$ . La fidelidad de copia dependiente de molde RNA había sido previamente analizada para las RTs del AMV y del VIH-1 grupo M subtipo B (aislado HXB2) (Boyer *et al.*, 1992). En ese trabajo se observó que la RT del AMV es 2,8 veces más fiel que la del VIH-1 (aislado HXB2). La tasa de error obtenida para la RT del AMV por estos autores fue de  $3,9 \times 10^{-5}$ , valor superior al obtenido en nuestros experimentos. Por otro lado, la tasa de error de la RT del clon HXB2 fue de  $1,1 \times 10^{-4}$ , también superior a la observada por nosotros utilizando el clon BH10.

**Tabla 22. Tasas de error para cada RT en función del molde utilizado.**

RT	Tipo de molde	Tasas de error		
		Todos los cambios	Cambios de base	Cambios en el marco de lectura
O_WT	DNA	$5,8 \times 10^{-5}$ (1/17166)	$1,1 \times 10^{-4}$ (1/9053)	$1,8 \times 10^{-6}$ (1/541516)
	RNA	$2,6 \times 10^{-5}$ (1/38570)	$1,9 \times 10^{-5}$ (1/51988)	$2,5 \times 10^{-5}$ (1/39570)
O_K65R	DNA	$6,2 \times 10^{-6}$ (1/160185)	$7,8 \times 10^{-6}$ (1/128649)	$3,4 \times 10^{-6}$ (1/291395)
	RNA	$2,2 \times 10^{-5}$ (1/44827)	$2,1 \times 10^{-5}$ (1/47286)	$1,8 \times 10^{-5}$ (1/55987)
O_K65R/V75I	DNA	$6,3 \times 10^{-6}$ (1/158288)	$9,3 \times 10^{-6}$ (1/107033)	$2,2 \times 10^{-6}$ (1/449304)
	RNA	$1,8 \times 10^{-5}$ (1/53926)	$2,6 \times 10^{-5}$ (1/38335)	$7,7 \times 10^{-5}$ (1/130492)
BH10_WT	DNA	$1,3 \times 10^{-4}$ (1/7369)	$1,7 \times 10^{-4}$ (1/5760)	$8,5 \times 10^{-5}$ (1/11745)
	RNA	$2,8 \times 10^{-5}$ (1/35931)	$2,4 \times 10^{-5}$ (1/41693)	$2,4 \times 10^{-5}$ (1/41137)
MLV	DNA	$1,2 \times 10^{-5}$ (1/86040)	$8,5 \times 10^{-6}$ (1/117032)	$1,1 \times 10^{-5}$ (1/87758)
	RNA	$2,4 \times 10^{-5}$ (1/41946)	$2,8 \times 10^{-5}$ (1/35092)	$1,4 \times 10^{-5}$ (1/70878)
AMV	DNA	ND <sup>a</sup>	ND	ND
	RNA	$2,7 \times 10^{-5}$ (1/37203)	$3,0 \times 10^{-5}$ (1/33750)	$1,8 \times 10^{-5}$ (1/55500)

<sup>a</sup> ND: Valor no determinado.

En los ensayos de fidelidad llevados a cabo en presencia de molde DNA, las RTs portadoras de los cambios K65R o K65R/V75I eran 9,2-9,3 veces más fieles que la enzima O\_WT. Sin embargo, cuando el molde utilizado es RNA, la diferencia se reduce a 1,2-1,4 veces. Las tasas de error obtenidas para las distintas enzimas en ensayos de síntesis de DNA utilizando DNA como molde oscilan entre  $6,2 \times 10^{-6}$  y  $1,3 \times 10^{-4}$ , es decir, que podemos observar una variación de hasta 20 veces en su fidelidad. Sin embargo, en el caso del ensayo dependiente de RNA el rango es sensiblemente inferior, ya que las tasas de error oscilan entre  $1,8 \times 10^{-5}$  y  $2,8 \times 10^{-5}$ .

Para algunas enzimas (BH10\_WT y O\_WT) se observa un considerable descenso en la tasa de error cuando la reacción de síntesis se lleva a cabo con RNA. Estas son polimerasas con tasas de error relativamente altas. Por ejemplo, en el caso de la RT BH10\_WT observamos que la tasa de error en presencia de molde DNA era  $1,3 \times 10^{-4}$ , 4,6 veces superior a la obtenida con molde RNA. Estos datos son consistentes con los publicados por Boyer *et al.* (1992), que sostienen que las RTs de retrovirus son más fieles en los ensayos en los que se usa RNA como molde. En otros análisis de tipo genético, basados en medidas de tasas de reversión usando el fago  $\Phi$ X174 se han estimado tasas de error entre 7 y 20 veces mayores para la polimerización sobre molde DNA (Hübner *et al.*, 1991). Sin embargo, otros autores no observan diferencias significativas. Por ejemplo, en análisis llevados a cabo con el plásmido pBluescript y el gen *lacZ* (Ji y Loeb, 1992) o utilizando el fago M13 y el *env* V1 como gen indicador (Ji y Loeb, 1994), las tasas de error obtenidas oscilan entre  $1,5 \times 10^{-4}$  y  $2,0 \times 10^{-4}$  para las reacciones dependientes tanto de molde de DNA como de molde RNA.

Los ensayos genéticos implican múltiples contextos de secuencia. Sin embargo, en ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido aparece la controversia entre autores que indican la ausencia de variación de fidelidad en función del molde utilizado (Yu y Goodman, 1992; Bakhanashvili y Hizi, 1993) y otros que describen diferencias relevantes dependientes del uso de DNA o RNA como molde (Kerr y Anderson, 1997; Kim *et al.*, 1998). Estas variaciones afectan a incorporación de nucleótidos o a la extensión de extremos desapareados. Se han observado variaciones de fidelidad de 10 a 60 veces cuando la enzima cataliza la reacción utilizando un molde RNA en vez de un molde DNA, debido a una extremadamente baja cinética de incorporación de incorrectos en el molde RNA (Kerr y Anderson, 1997). En un ensayo cualitativo de extensión del oligonucleótido en ausencia de un nucleótido no se observaron diferencias en las eficiencias de síntesis del DNA usando como molde una secuencia de RNA o de DNA



cuando los cuatro nucleótidos están presentes en la reacción. Pero en ausencia del dTTP, cuando se utiliza un molde RNA la enzima no consigue extender completamente el oligonucleótido, sin embargo, la extensión es total cuando se utiliza DNA como molde (Kim *et al.*, 1998). Estos datos sugerirían una mayor fidelidad durante la síntesis de DNA en presencia de molde RNA.

Las tasas de error obtenidas por nosotros utilizando RNA como molde fueron muy parecidas para todas las enzimas, tendiendo a igualarse alrededor de  $2,3 \times 10^{-5}$ . Este valor es claramente superior al obtenido en reacciones de síntesis con molde DNA con enzimas de alta fidelidad (por ejemplo, las RTs O\_K65R, O\_K65R/V75I y la RT del MLV). Si asumimos que la fidelidad de las RTs aumenta en presencia de RNA, estos valores anormalmente altos se atribuirían a un nivel basal de errores que podría tener su origen en mutaciones introducidas por la RNA polimerasa del fago T7 durante la síntesis del molde RNA utilizado en el ensayo. Teóricamente, en los ensayos de fidelidad dependientes de molde DNA, el fondo ("background") sería inferior a  $10^{-7}$ , ya que correspondería a los errores cometidos por polimerasas replicativas de *E. coli* (Matsuda *et al.*, 2000; Bebenek *et al.*, 2004; McCulloch y Kunkel, 2008). Sin embargo, aunque no se tiene información fidedigna de la fidelidad de copia de la T7 RNA polimerasa, esta enzima carece de actividad correctora y posiblemente contribuye con una tasa de error de  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  (Arand *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2010).

Concluir si un determinado error procede de la transcripción del RNA usado como molde o si es debido a la reacción de síntesis llevada a cabo por la RT no es posible utilizando los ensayos basados en la expresión del gen *lacZ*. Sin embargo, si se llevan a cabo simultáneamente las reacciones de síntesis de cDNAs a partir del mismo RNA con las RTs del MLV y del AMV y las distintas RTs del VIH-1 podemos deducir qué errores proceden de la síntesis del RNA, pues serían aquellos que aparecen en la misma posición y con la misma frecuencia en los espectros de mutantes de todas las enzimas.

En nuestro análisis, la inserción de una T en la posición +139 sería un claro ejemplo. Observamos este cambio en los espectros de mutaciones de todas las enzimas estudiadas. Esto nos sugiere que es un cambio que proviene del RNA utilizado como molde y no un cambio producido por la enzima. Este cambio representa entre un 15% y un 20% del número total de cambios observados para cada enzima. Si calculamos las tasas de error sin tener en cuenta esta inserción en la posición +139 seguimos obteniendo las mismas diferencias de fidelidad, siendo el doble mutante O\_K65R/V75I el

que muestra la fidelidad más alta con una tasa de error de  $1,7 \times 10^{-5}$ . Por otro lado, la RT del BH10\_WT muestra la fidelidad más baja con una tasa de  $2,4 \times 10^{-5}$ . La inserción de T en la posición +139 también fue descrita por Boyer *et al.* (1992), quienes observaron este error en todos los espectros de mutaciones analizados en su trabajo.

Otros tipos de cambios observados repetidamente en los espectros de las RTs analizadas como por ejemplo la delección de 59-60 bases en la posición +115, aunque no fueron comunes a todas las enzimas. En concreto este error lo observamos solamente en los espectros de las RTs O\_WT, O\_K65R y BH10\_WT, por lo que se considera un error específico y común a estas tres enzimas.

Si asumimos las limitaciones descritas anteriormente, las enzimas de alta fidelidad estudiadas (O\_K65R y O\_K65R/V75I) tendrían tasas de error en reacciones dependientes de RNA inferiores a las observadas en nuestros ensayos, pero, para una determinación precisa de su tasa de error en reacciones dependientes de RNA deberíamos disponer de un molde con una secuencia más homogénea o una RNA polimerasa más fiel que la del fago T7 para sintetizar el molde.

La síntesis de cDNA a partir de RNA es útil para la detección de productos génicos en pruebas de diagnóstico, clonajes de cDNA, RT-PCR, “end-point” PCR, secuenciación masiva (RNA-seq) o análisis de expresión génica (como los “microarrays”). En este trabajo hemos descrito variantes de la RT del VIH-1 que muestran mayor actividad que las RTs del AMV o del MLV a 50-60°C (Gerard *et al.*, 2002; Yasukawa *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2009). Es importante resaltar que la RT O\_WT muestra una estabilidad a temperatura elevada (aproximadamente 55°C) similar a la descrita para enzimas comerciales como AffinityScript (Agilent Technologies), variante de la RT del MLV portadora de múltiples cambios que se caracteriza por su elevada termoestabilidad (Arezi y Hogrefe 2009).

En principio, el objetivo de conseguir una enzima más fiel se ha alcanzado con la obtención de variantes de la RT del VIH-1 grupo O portadoras de los cambios K65R y K65R/V75. Estas RTs mantuvieron la estabilidad a temperaturas elevadas mostrada por la enzima “wild type”, pero presentaron una fidelidad unas 9 veces superior, alcanzando tasas de error similares a las de la RT del MLV. Estas propiedades hacen que las RTs O\_K65R y O\_K65R/V75I sean idóneas para su uso en técnicas de DNA recombinante, en las que la eficacia catalítica a temperaturas elevadas y la fidelidad de copia son importantes para la obtención de resultados óptimos. Futuros estudios deberían abordar

cómo la temperatura puede influir en la fidelidad a temperaturas empleadas en las reacciones de síntesis de cDNA (por ejemplo, 50°C o 55°C).

## **6. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Las RTs del MLV y del XMRV mostraron eficiencias catalíticas entre 13,9 y 110 veces más bajas que las enzimas del VIH-1 en la incorporación de nucleótidos correctos. Este efecto se debe a que sus constantes catalíticas de polimerización ( $k_{pol}$ ) son de 10 a 100 veces más bajas que las obtenidas para RTs de *Lentivirus*.

2. Los ensayos cinéticos de extensión de extremos desapareados y de incorporación de nucleótidos erróneos demuestran que la RT del MLV es más fiel que las RTs “wild type” del VIH-1 analizadas. En comparación con la enzima del MLV, la RT del XMRV mostró una mayor eficiencia en la extensión de extremos desapareados y en la incorporación de C o A frente A. Sin embargo, se observó que la RT del XMRV tiene una selectividad elevada en la incorporación de G frente A.

3. Las enzimas del XMRV y del MLV mostraron tasas de error similares en la síntesis de DNA dependiente de DNA, en ensayos basados en la expresión del gen *lacZ*. Ambas RTs son entre 5 y 15 veces más fieles que las enzimas “wild type” del VIH-1 grupo M subtipo B (BH10) y de grupo O (ESP49).

4. Los espectros de mutaciones de las RTs del XMRV y del MLV fueron similares. Ambas enzimas cometen con frecuencia errores que provocan cambios en el marco de lectura. Sin embargo, en el caso de la RT del MLV abundan las deleciones largas, mientras que la enzima del XMRV produce muchas deleciones puntuales de un nucleótido. En comparación con las RTs del VIH-1, los espectros generados por las RTs de *Gammaretrovirus* presentan un menor número de “hot spots”, distribuyéndose las mutaciones de forma más o menos homogénea a lo largo de toda la secuencia.

5. Los cambios K65R y K65R/V75I en el contexto de secuencia de la RT del VIH-1 grupo O mantienen niveles de actividad DNA polimerasa similares a los de la enzima no mutada, a temperaturas por encima de los 56°C. La estabilidad a temperaturas altas de estas variantes de la RT de grupo O es superior a la que muestran las RTs del VIH-1 clon BH10 y del MLV. Sin embargo, la mutación R78A tiene un efecto desestabilizador de la enzima, tanto en presencia como en ausencia del cambio V75I.

6. Las RTs portadoras de los cambios K65R, K65R/V75I y R78A mostraron eficiencias de extensión de extremos desapareados y de incorporación de nucleótidos

erróneos inferiores a las obtenidas con la RT “wild type”. Estos ensayos revelaron que la selectividad por el nucleótido en el caso de la RT mutante K65R está controlada principalmente por la constante de polimerización ( $k_{pol}$ ), mientras que en las RTs mutantes K65R/V75I y R78A, tanto la  $k_{pol}$  como la  $K_d$  (afinidad por el nucleótido) son responsables de su fidelidad alterada.

**7.** Las RTs mutantes K65R, K65R/V75I y R78A tienen una fidelidad de síntesis de DNA dependiente de DNA que es hasta 13 veces más alta que la de la enzima “wild type” en ensayos basados en la expresión del gen *lacZ*. Las tasas de error mostradas por variantes de la RT del VIH-1 grupo O fueron más bajas que las obtenidas con RTs de *Gammaretrovirus*.

**8.** En comparación con la enzima del MLV, todas las RTs del VIH-1 de grupo O se caracterizaron por tener tasas de error bajas en la producción de deleciones e inserciones. Sin embargo, la enzima portadora del cambio K65R mostró una tendencia superior a la de las otras RTs de grupo O en la generación de deleciones de un único nucleótido.

**9.** La RT del VIH-1 portadora de los cambios K65R/V75I también presentó la tasa de error más baja en reacciones de síntesis de DNA utilizando RNA como molde, superando incluso la fidelidad descrita para las enzimas del MLV y del AMV. En este análisis las diferencias de fidelidad fueron menores a las observadas cuando se usó DNA como molde.

**10.** En general, los datos de los ensayos basados en la expresión del gen *lacZ* indican que las RTs son más fieles cuando el molde es RNA que cuando se usa DNA. Sin embargo, este efecto no puede observarse con las RTs más fieles. Es probable que la baja fidelidad intrínseca de la RNA polimerasa del fago T7 genere heterogeneidad en la secuencia del molde y de esta forma evite que se alcancen tasas de error inferiores a  $1,8 \times 10^{-5}$  en los ensayos genéticos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Adamson, C. S. y Freed, E. O. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Adv Pharmacol* **55**, 347-387.

Agopian, A., Depollier, J., Lionne, C. y Divita, G. (2007). p66 Trp24 and Phe61 are essential for accurate association of HIV-1 reverse transcriptase with primer/template. *J Mol Biol* **373**, 127-140.

Alkhatib, G. (2009). The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS* **4**, 96-103.

Alter, H. J., Mikovits, J. A., Switzer, W. M., Ruscetti, F. W., Lo, S. C., Klimas, N., Komaroff, A. L., Montoya, J. G., Bateman, L., Levine, S., Peterson, D., Levin, B., Hanson, M. R., Genfi, A., Bhat, M., Zheng, H., Wang, R., Li, B., Hung, G. C., Lee, L. L., Sameroff, S., Heneine, W., Coffin, J., Hornig, M. y Lipkin, W. I. (2012). A multicenter blinded analysis indicates no association between chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis and either xenotropic murine leukemia virus-related virus or polytropic murine leukemia virus. *MBio* **3**

Álvarez, M., Matamoros, T. y Menéndez-Arias, L. (2009). Increased thermostability and fidelity of DNA synthesis of wild-type and mutant HIV-1 group O reverse transcriptases. *J Mol Biol* **392**, 872-884.

Álvarez, M., Barrioluengo, V., Afonso-Lehmann, R. N. y Menéndez-Arias, L. (2013). Altered error specificity of RNase H-deficient HIV-1 reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* **41**, 4601-4612.

Anand, V. S. y Patel, S. S. (2006). Transient state kinetics of transcription elongation by T7 RNA polymerase. *J Biol Chem* **281**, 35677-35685.

Arezi, B. y Hogrefe, H. H. (2007). Escherichia coli DNA polymerase III epsilon subunit increases Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase fidelity and accuracy of RT-PCR procedures. *Anal Biochem* **360**, 84-91.

Arezi, B. y Hogrefe, H. (2009). Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer. *Nucleic Acids Res* **37**, 473-481.

Arnold, R. S., Makarova, N. V., Osunkoya, A. O., Suppiah, S., Scott, T. A., Johnson, N. A., Bhosle, S. M., Liotta, D., Hunter, E., Marshall, F. F., Ly, H., Molinaro, R. J., Blackwell,



J. L. y Petros, J. A. (2010). XMRV infection in patients with prostate cancer: novel serologic assay and correlation with PCR and FISH. *Urology* **75**, 755-761.

Avidan, O., Meer, M. E., Oz, I. y Hizi, A. (2002). The processivity and fidelity of DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus. *Eur J Biochem* **269**, 859-867.

Bakhanashvili, M. y Hizi, A. (1992a). Fidelity of the RNA-dependent DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptases of human immunodeficiency virus types 1 and 2 and of murine leukemia virus: mispair extension frequencies. *Biochemistry* **31**, 9393-9398.

Bakhanashvili, M. y Hizi, A. (1992b). Fidelity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 2. *FEBS Lett* **306**, 151-156.

Bakhanashvili, M. y Hizi, A. (1993). The fidelity of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses and murine leukemia virus, exhibited by the mispair extension frequencies, is sequence dependent and enzyme related. *FEBS Lett* **319**, 201-205.

Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211.

Baranauskas, A., Paliksa, S., Alzbutas, G., Vaitkevicius, M., Lubiene, J., Letukiene, V., Burinskas, S., Sasnauskas, G. y Skirgaila, R. (2012). Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Eng Des Sel* **25**, 657-668.

Barnes, W. M. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2216-2220.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. y Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.

Baumann, P. y Jackson, S. P. (1996). An archaeobacterial homologue of the essential eubacterial cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6726-6730.

Beard, W. A. y Wilson, S. H. (1998). Structural insights into DNA polymerase beta fidelity: hold tight if you want it right. *Chem Biol* **5**, R7-13.

Beard, W. A., Bebenek, K., Darden, T. A., Li, L., Prasad, R., Kunkel, T. A. y Wilson, S. H. (1998). Vertical-scanning mutagenesis of a critical tryptophan in the minor groove binding track of HIV-1 reverse transcriptase. Molecular nature of polymerase-nucleic acid interactions. *J Biol Chem* **273**, 30435-30442.

Beard, W. A. y Wilson, S. H. (1994). Site-directed mutagenesis of HIV reverse transcriptase to probe enzyme processivity and drug binding. *Curr Opin Biotechnol* **5**, 414-421.

Bebenek, K., Abbotts, J., Roberts, J. D., Wilson, S. H. y Kunkel, T. A. (1989). Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **264**, 16948-16956.

Bebenek, K., Abbotts, J., Wilson, S. H. y Kunkel, T. A. (1993). Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. Contribution of template-primer misalignment, miscoding, and termination probability to mutational hot spots. *J Biol Chem* **268**, 10324-10334.

Bebenek, K., Beard, W. A., Casas-Finet, J. R., Kim, H. R., Darden, T. A., Wilson, S. H. y Kunkel, T. A. (1995). Reduced frameshift fidelity and processivity of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing alanine substitutions in helix H of the thumb subdomain. *J Biol Chem* **270**, 19516-19523.

Bebenek, K. y Kunkel, T. A. (1995). Analyzing fidelity of DNA polymerases. *Methods Enzymol* **262**, 217-232.

Bebenek, K. y Kunkel, T. A. (2004). Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem* **69**, 137-165.

Benzair, A. B., Rhodes-Feuillette, A., Emanoil-Ravicovitch, R. y Peries, J. (1982). Reverse transcriptase from simian foamy virus serotype 1: purification and characterization. *J Virol* **44**, 720-724.

Boretto, J., Longhi, S., Navarro, J. M., Selmi, B., Sire, J. y Canard, B. (2001). An integrated system to study multiply substituted human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Anal Biochem* **292**, 139-147.

Boyer, J. C., Bebenek, K. y Kunkel, T. A. (1992). Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6919-6923.

Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. y Hughes, S. H. (2000). Analysis of mutations at positions 115 and 116 in the dNTP binding site of HIV-1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3056-3061.

Boyer, P. L., Stenbak, C. R., Hoberman, D., Linial, M. L. y Hughes, S. H. (2007). In vitro fidelity of the prototype primate foamy virus (PFV) RT compared to HIV-1 RT. *Virology* **367**, 253-264.

Buonaguro, L., Tornesello, M. L. y Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* **81**, 10209-10219.

Cases-González, C. E., Gutiérrez-Rivas, M. y Menéndez-Arias, L. (2000). Coupling ribose selection to fidelity of DNA synthesis. The role of Tyr-115 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **275**, 19759-19767.

Cases-González, C. E. y Menéndez-Arias, L. (2004). Increased G→A transition frequencies displayed by primer grip mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* **78**, 1012-1019.

Cases-González, C. E. y Menéndez-Arias, L. (2005). Nucleotide specificity of HIV-1 reverse transcriptases with amino acid substitutions affecting Ala-114. *Biochem J* **387**, 221-229.

Charneau, P., Borman, A. M., Quillent, C., Guetard, D., Chamaret, S., Cohen, J., Remy, G., Montagnier, L. y Clavel, F. (1994). Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* **205**, 247-253.

Chien, A., Edgar, D. B. y Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* **127**, 1550-1557.

Ciccozzi, M., Santoro, M. M., Giovanetti, M., Andrissi, L., Bertoli, A. y Ciotti, M. (2012). HIV-1 non-B subtypes in Italy: a growing trend. *New Microbiol* **35**, 377-386.

Cingöz, O., Paprotka, T., Delviks-Frankenberry, K. A., Wildt, S., Hu, W. S., Pathak, V. K. y Coffin, J. M. (2012). Characterization, mapping, and distribution of the two XMRV parental proviruses. *J Virol* **86**, 328-338.

Coté, M. L. y Roth, M. J. (2008). Murine leukemia virus reverse transcriptase: structural comparison with HIV-1 reverse transcriptase. *Virus Res* **134**, 186-202.

Cramer, J., Strerath, M., Marx, A. y Restle, T. (2002). Exploring the effects of active site constraints on HIV-1 reverse transcriptase DNA polymerase fidelity. *J Biol Chem* **277**, 43593-43598.

Creighton, S., Huang, M. M., Cai, H., Arnheim, N. y Goodman, M. F. (1992). Base mispair extension kinetics. Binding of avian myeloblastosis reverse transcriptase to matched and mismatched base pair termini. *J Biol Chem* **267**, 2633-2639.

Dahl, V., Josefsson, L. y Palmer, S. (2010). HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication. *Antiviral Res* **85**, 286-294.

Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. y Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767.

Das, D. y Georgiadis, M. M. (2004). The crystal structure of the monomeric reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus. *Structure* **12**, 819-829.

Dash, C., Scarth, B. J., Badorrek, C., Gotte, M. y Le Grice, S. F. (2008). Examining the ribonuclease H primer grip of HIV-1 reverse transcriptase by charge neutralization of RNA/DNA hybrids. *Nucleic Acids Res* **36**, 6363-6371.

De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., Willems, B. y et al. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* **64**, 1207-1216.

Delaporte, E., Janssens, W., Peeters, M., Buve, A., Dibanga, G., Perret, J. L., Ditsambou, V., Mba, J. R., Courbot, M. C., Georges, A., Bourgeois, A., Samb, B., Henzel, D., Heyndrickx, L., Fransen, K., van der Groen, G. y Larouze, B. (1996). Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Gabon, 1986-1994. *AIDS* **10**, 903-910.

Depatureaux, A., Leoz, M., De Oliveira, F., Gueudin, M., Damond, F., Descamps, D., Brun-Vezinet, F., Lemee, V., Simon, F., Barin, F. y Plantier, J. C. (2010). [Specific diagnosis and follow-up of HIV-1 group O infection: RES-O data]. *Med Mal Infect* **40**, 669-676.

Descamps, D., Collin, G., Loussert-Ajaka, I., Saragosti, S., Simon, F. y Brun-Vezinet, F. (1995). HIV-1 group O sensitivity to antiretroviral drugs. *AIDS* **9**, 977-978.

DeStefano, J. J., Buiser, R. G., Mallaber, L. M., Bambara, R. A. y Fay, P. J. (1991). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase displays a partially processive 3' to 5' endonuclease activity. *J Biol Chem* **266**, 24295-24301.

DeStefano, J. J., Bambara, R. A. y Fay, P. J. (1994). The mechanism of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-catalyzed strand transfer from internal regions of heteropolymeric RNA templates. *J Biol Chem* **269**, 161-168.

Deval, J., Navarro, J. M., Selmi, B., Courcambeck, J., Boretto, J., Halfon, P., Garrido-Urbani, S., Sire, J. y Canard, B. (2004). A loss of viral replicative capacity correlates with altered DNA polymerization kinetics by the human immunodeficiency virus reverse transcriptase bearing the K65R and L74V dideoxynucleoside resistance substitutions. *J Biol Chem* **279**, 25489-25496.

Diamond, T. L., Souroullas, G., Weiss, K. K., Lee, K. Y., Bambara, R. A., Dewhurst, S. y Kim, B. (2003). Mechanistic understanding of an altered fidelity simian immunodeficiency virus reverse transcriptase mutation, V148I, identified in a pig-tailed macaque. *J Biol Chem* **278**, 29913-29924.

Ding, J., Das, K., Hsiou, Y., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Jacobo-Molina, A., Tantillo, C., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1998). Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **284**, 1095-1111.

Ding, J., Das, K., Tantillo, C., Zhang, W., Clark, A. D., Jr., Jessen, S., Lu, X., Hsiou, Y., Jacobo-Molina, A., Andries, K. y et al. (1995). Structure of HIV-1 reverse transcriptase in a complex with the non-nucleoside inhibitor alpha-APA R 95845 at 2.8 Å resolution. *Structure* **3**, 365-379.

Domingo, E., Menéndez-Arias, L., Quiñones-Mateu, M. E., Holguín, A., Gutiérrez-Rivas, M., Martínez, M. A., Quer, J., Novella, I. S. y Holland, J. J. (1997). Viral quasiespecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Prog Drug Res* **48**, 99-128.

Dong, B., Kim, S., Hong, S., Das Gupta, J., Malathi, K., Klein, E. A., Ganem, D., Derisi, J. L., Chow, S. A. y Silverman, R. H. (2007). An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1655-1660.

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. y Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.

Eberle, J. y Gurtler, L. (2012). HIV types, groups, subtypes and recombinant forms: errors in replication, selection pressure and quasispecies. *Intervirolgy* **55**, 79-83.

Echols, H. y Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**, 477-511.

Eckert, K. A. y Kunkel, T. A. (1993). Effect of reaction pH on the fidelity and processivity of exonuclease-deficient Klenow polymerase. *J Biol Chem* **268**, 13462-13471.

Erlwein, O., Kaye, S., McClure, M. O., Weber, J., Wills, G., Collier, D., Wessely, S. y Cleare, A. (2010a). Failure to detect the novel retrovirus XMRV in chronic fatigue syndrome. *PLoS One* **5**, e8519.

Erlwein, O., Kaye, S., Robinson, M. y McClure, M. (2010b). Chronic fatigue syndrome: xenotropic murine leukemia virus-related virus, murine leukemia virus, both, or neither? *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, E161; author reply E163-164.

Esnouf, R., Ren, J., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D. y Stuart, D. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* **2**, 303-308.

Euler, M., Wang, Y., Nentwich, O., Piepenburg, O., Hufert, F. T. y Weidmann, M. (2012). Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus. *J Clin Virol* **54**, 308-312.

Fan, N., Rank, K. B., Leone, J. W., Heinrikson, R. L., Bannow, C. A., Smith, C. W., Evans, D. B., Poppe, S. M., Tarpley, W. G., Rothrock, D. J. y et al. (1995). The differential processing of homodimers of reverse transcriptases from human immunodeficiency viruses type 1 and 2 is a consequence of the distinct specificities of the viral proteases. *J Biol Chem* **270**, 13573-13579.

Fan, N., Rank, K. B., Poppe, S. M., Tarpley, W. G. y Sharma, S. K. (1996). Characterization of the p68/p58 heterodimer of human immunodeficiency virus type 2 reverse transcriptase. *Biochemistry* **35**, 1911-1917.

Feng, J. Y. y Anderson, K. S. (1999). Mechanistic studies examining the efficiency and fidelity of DNA synthesis by the 3TC-resistant mutant (184V) of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **38**, 9440-9448.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. y Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877.

Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M. y Jonczyk, P. (2012). DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 1105-1121.

Fisher, T. S. y Prasad, V. R. (2002). Substitutions of Phe61 located in the vicinity of template 5'-overhang influence polymerase fidelity and nucleoside analog sensitivity of HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **277**, 22345-22352.

Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H., Fischer, U. y Malim, M. H. (1997). HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO J* **16**, 4531-4539.

Gallo, R. C. y Wong-Staal, F. (1984). Current thoughts on the viral etiology of certain human cancers: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture. *Cancer Res* **44**, 2743-2749.

Garforth, S. J., Domaoal, R. A., Lwatula, C., Landau, M. J., Meyer, A. J., Anderson, K. S. y Prasad, V. R. (2010). K65R and K65A substitutions in HIV-1 reverse transcriptase enhance polymerase fidelity by decreasing both dNTP misinsertion and mispaired primer extension efficiencies. *J Mol Biol* **401**, 33-44.

Georgiadis, M. M., Jessen, S. M., Ogata, C. M., Telesnitsky, A., Goff, S. P. y Hendrickson, W. A. (1995). Mechanistic implications from the structure of a catalytic fragment of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Structure* **3**, 879-892.

Gerard, G. F., Fox, D. K., Nathan, M. y D'Alessio, J. M. (1997). Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biotechnol* **8**, 61-77.

Gerard, G. F., Potter, R. J., Smith, M. D., Rosenthal, K., Dhariwal, G., Lee, J. y Chatterjee, D. K. (2002). The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation. *Nucleic Acids Res* **30**, 3118-3129.

Gillette, W. K., Esposito, D., Taylor, T. E., Hopkins, R. F., Bagni, R. K. y Hartley, J. L. (2011). Purify First: rapid expression and purification of proteins from XMRV. *Protein Expr Purif* **76**, 238-247.

Goel, R., Beard, W. A., Kumar, A., Casas-Finet, J. R., Strub, M. P., Stahl, S. J., Lewis, M. S., Bebenek, K., Becerra, S. P., Kunkel, T. A. y et al. (1993). Structure/function studies of HIV-1(1) reverse transcriptase: dimerization-defective mutant L289K. *Biochemistry* **32**, 13012-13018.

Götte, M., Li, X. y Wainberg, M. A. (1999). HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys* **365**, 199-210.

Gould, K., Britvan, L. y Dryjanski, J. (1996). HIV-1 group O infection in the USA. *Lancet* **348**, 680-681.

Grandgenett, D. P., Gerard, G. F. y Green, M. (1973). A single subunit from avian myeloblastosis virus with both RNA-directed DNA polymerase and ribonuclease H activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 230-234.

Groom, H. C., Boucherit, V. C., Makinson, K., Randal, E., Baptista, S., Hagan, S., Gow, J. W., Mattes, F. M., Breuer, J., Kerr, J. R., Stoye, J. P. y Bishop, K. N. (2010). Absence of xenotropic murine leukaemia virus-related virus in UK patients with chronic fatigue syndrome. *Retrovirology* **7**, 10.

Gutiérrez-Rivas, M., Ibañez, A., Martínez, M. A., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (1999). Mutational analysis of Phe160 within the "palm" subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Mol Biol* **290**, 615-625.

Gutiérrez-Rivas, M. y Menéndez-Arias, L. (2001). A mutation in the primer grip region of HIV-1 reverse transcriptase that confers reduced fidelity of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* **29**, 4963-4972.

Hamburgh, M. E., Drosopoulos, W. C. y Prasad, V. R. (1998). The influence of 3TC-resistance mutations E89G and M184V in the human immunodeficiency virus reverse transcriptase on mispair extension efficiency. *Nucleic Acids Res* **26**, 4389-4394.

Hamburgh, M. E., Curr, K. A., Monaghan, M., Rao, V. R., Tripathi, S., Preston, B. D., Sarafianos, S., Arnold, E., Darden, T. y Prasad, V. R. (2006). Structural determinants of slippage-mediated mutations by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **281**, 7421-7428.



Hampl, H., Sawitzky, D., Stoffler-Meilicke, M., Groh, A., Schmitt, M., Eberle, J. y Gurtler, L. (1995). First case of HIV-1 subtype O infection in Germany. *Infection* **23**, 369-370.

Harrison, G. P., Mayo, M. S., Hunter, E. y Lever, A. M. (1998). Pausing of reverse transcriptase on retroviral RNA templates is influenced by secondary structures both 5' and 3' of the catalytic site. *Nucleic Acids Res* **26**, 3433-3442.

Hartl, M. J., Mayr, F., Rethwilm, A. y Wohrl, B. M. (2010). Biophysical and enzymatic properties of the simian and prototype foamy virus reverse transcriptases. *Retrovirology* **7**, 5.

Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D. y Osmanov, S. (2011). Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* **25**, 679-689.

Henrich, T. J., Li, J. Z., Felsenstein, D., Kotton, C. N., Plenge, R. M., Pereyra, F., Marty, F. M., Lin, N. H., Grazioso, P., Crochiere, D. M., Eggers, D., Kuritzkes, D. R. y Tsibris, A. M. (2010). Xenotropic murine leukemia virus-related virus prevalence in patients with chronic fatigue syndrome or chronic immunomodulatory conditions. *J Infect Dis* **202**, 1478-1481.

Herschhorn, A. y Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cell Mol Life Sci* **67**, 2717-2747.

Heyndrickx, L., Alary, M., Janssens, W., Davo, N. y van der Groen, G. (1996). HIV-1 group O and group M dual infection in Benin. *Lancet* **347**, 902-903.

Hizi, A., Leis, J. P. y Joklik, W. K. (1977). RNA-dependent DNA polymerase of avian sarcoma virus B77. II. Comparison of the catalytic properties of the alpha, beta2, and alphabeta enzyme forms. *J Biol Chem* **252**, 2290-2295.

Hizi, A. y Herschhorn, A. (2008). Retroviral reverse transcriptases (other than those of HIV-1 and murine leukemia virus): a comparison of their molecular and biochemical properties. *Virus Res* **134**, 203-220.

Hong, S., Klein, E. A., Das Gupta, J., Hanke, K., Weight, C. J., Nguyen, C., Gaughan, C., Kim, K. A., Bannert, N., Kirchhoff, F., Munch, J. y Silverman, R. H. (2009). Fibrils of prostatic acid phosphatase fragments boost infections with XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus), a human retrovirus associated with prostate cancer. *J Virol* **83**, 6995-7003.

Hsiou, Y., Ding, J., Das, K., Clark, A. D., Jr., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1996). Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure* **4**, 853-860.

Hsu, M., Inouye, P., Rezende, L., Richard, N., Li, Z., Prasad, V. R. y Wainberg, M. A. (1997). Higher fidelity of RNA-dependent DNA mispair extension by M184V drug-resistant than wild-type reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* **25**, 4532-4536.

Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. y Harrison, S. C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* **282**, 1669-1675.

Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J. y Varmus, H. E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**, 280-283.

Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R. G., Clark, A. D., Jr., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R. L., Kamer, G., Ferris, A. L., Clark, P. y et al. (1993). Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6320-6324.

Jamburuthugoda, V. K., Guo, D., Wedekind, J. E. y Kim, B. (2005). Kinetic evidence for interaction of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with the 3'-OH of the incoming dTTP substrate. *Biochemistry* **44**, 10635-10643.

Jamburuthugoda, V. K. y Eickbush, T. H. (2011). The reverse transcriptase encoded by the non-LTR retrotransposon R2 is as error-prone as that encoded by HIV-1. *J Mol Biol* **407**, 661-672.

Ji, J. y Loeb, L. A. (1994). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying a hypervariable region of the HIV-1 env gene. *Virology* **199**, 323-330.

Ji, J. P. y Loeb, L. A. (1992). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying RNA in vitro. *Biochemistry* **31**, 954-958.

Johnson, K. A. (1993). Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annu Rev Biochem* **62**, 685-713.

- Jonckheere, H., Anne, J. y De Clercq, E. (2000a). The HIV-1 reverse transcription (RT) process as target for RT inhibitors. *Med Res Rev* **20**, 129-154.
- Jonckheere, H., De Clercq, E. y Anne, J. (2000b). Fidelity analysis of HIV-1 reverse transcriptase mutants with an altered amino-acid sequence at residues Leu74, Glu89, Tyr115, Tyr183 and Met184. *Eur J Biochem* **267**, 2658-2665.
- Kabeya, C. M., Esu-Williams, E., Eni, E., Peeters, M., Saman, E. y Delaporte, E. (1995). Evidence for HIV-1 group O infection in Nigeria. *Lancet* **346**, 308.
- Kaledin, A. S., Sliusarenko, A. G. y Gorodetskii, S. I. (1981). [Isolation and properties of DNA-polymerase from the extreme thermophilic bacterium *Thermus flavus*]. *Biokhimiia* **46**, 1576-1584.
- Kalmar, A., Wichmann, B., Galamb, O., Spisak, S., Toth, K., Leiszter, K., Tulassay, Z. y Molnar, B. (2013). Gene expression analysis of normal and colorectal cancer tissue samples from fresh frozen and matched formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens after manual and automated RNA isolation. *Methods* **59**, S16-19.
- Kati, W. M., Johnson, K. A., Jerva, L. F. y Anderson, K. S. (1992). Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *J Biol Chem* **267**, 25988-25997.
- Kerr, S. G. y Anderson, K. S. (1997). RNA dependent DNA replication fidelity of HIV-1 reverse transcriptase: evidence of discrimination between DNA and RNA substrates. *Biochemistry* **36**, 14056-14063.
- Kilareski, E. M., Shah, S., Nonnemacher, M. R. y Wigdahl, B. (2009). Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* **6**, 118.
- Kim, B., Hathaway, T. R. y Loeb, L. A. (1998). Fidelity of mutant HIV-1 reverse transcriptases: interaction with the single-stranded template influences the accuracy of DNA synthesis. *Biochemistry* **37**, 5831-5839.
- Kim, B., Ayran, J. C., Sagar, S. G., Adman, E. T., Fuller, S. M., Tran, N. H. y Horrigan, J. (1999). New human immunodeficiency virus, type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) mutants with increased fidelity of DNA synthesis. Accuracy, template binding, and processivity. *J Biol Chem* **274**, 27666-27673.

- Kim, J. H., Kang, S., Jung, S. K., Yu, K. R., Chung, S. J., Chung, B. H., Erikson, R. L., Kim, B. Y. y Kim, S. J. (2012). Crystal structure of xenotropic murine leukaemia virus-related virus (XMRV) ribonuclease H. *Biosci Rep* **32**, 455-463.
- Kirby, K. A., Marchand, B., Ong, Y. T., Ndongwe, T. P., Hachiya, A., Michailidis, E., Leslie, M. D., Sietsema, D. V., Fetterly, T. L., Dorst, C. A., Singh, K., Wang, Z., Parniak, M. A. y Sarafianos, S. G. (2012). Structural and inhibition studies of the RNase H function of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2048-2061.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. y Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768.
- Knapp, D. C., Serva, S., D'Onofrio, J., Keller, A., Lubys, A., Kurg, A., Remm, M. y Engels, J. W. (2011). Fluoride-cleavable, fluorescently labelled reversible terminators: synthesis and use in primer extension. *Chemistry* **17**, 2903-2915.
- Knouf, E. C., Metzger, M. J., Mitchell, P. S., Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Tewari, M. y Miller, A. D. (2009). Multiple integrated copies and high-level production of the human retrovirus XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus) from 22Rv1 prostate carcinoma cells. *J Virol* **83**, 7353-7356.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. y Steitz, T. A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**, 1783-1790.
- Konishi, A., Yasukawa, K. y Inouye, K. (2012). Improving the thermal stability of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase alpha-subunit by site-directed mutagenesis. *Biotechnol Lett* **34**, 1209-1215.
- Kotewicz, M. L., Sampson, C. M., D'Alessio, J. M. y Gerard, G. F. (1988). Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucleic Acids Res* **16**, 265-277.
- Kranaster, R., Drum, M., Engel, N., Weidmann, M., Hufert, F. T. y Marx, A. (2010). One-step RNA pathogen detection with reverse transcriptase activity of a mutated thermostable *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biotechnol J* **5**, 224-231.
- Krebs, J. F. y Kore, A. R. (2008). Novel FRET-based assay to detect reverse transcriptase activity using modified dUTP analogues. *Bioconjug Chem* **19**, 185-191.

Kunkel, T. A. y Alexander, P. S. (1986). The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *J Biol Chem* **261**, 160-166.

Lanciault, C. y Champoux, J. J. (2006). Pausing during reverse transcription increases the rate of retroviral recombination. *J Virol* **80**, 2483-2494.

Laughlin, M. A. y Pomerantz, R. J. (1994). Cellular latency in HIV-1 infection. *Clin Lab Med* **14**, 239-255.

Leo, B., Hartl, M. J., Schweimer, K., Mayr, F. y Wohrl, B. M. (2012a). Insights into the structure and activity of prototype foamy virus RNase H. *Retrovirology* **9**, 14.

Leo, B., Schweimer, K., Rosch, P., Hartl, M. J. y Wohrl, B. M. (2012b). The solution structure of the prototype foamy virus RNase H domain indicates an important role of the basic loop in substrate binding. *Retrovirology* **9**, 73.

Levesque-Sergerie, J. P., Duquette, M., Thibault, C., Delbecchi, L. y Bissonnette, N. (2007). Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* **8**, 93.

Levy, J. A., Mitra, G. y Mozen, M. M. (1984). Recovery and inactivation of infectious retroviruses from factor VIII concentration. *Lancet* **2**, 722-723.

Lewis, D. A., Bebenek, K., Beard, W. A., Wilson, S. H. y Kunkel, T. A. (1999). Uniquely altered DNA replication fidelity conferred by an amino acid change in the nucleotide binding pocket of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **274**, 32924-32930.

Lim, D., Gregorio, G. G., Bingman, C., Martinez-Hackert, E., Hendrickson, W. A. y Goff, S. P. (2006). Crystal structure of the moloney murine leukemia virus RNase H domain. *J Virol* **80**, 8379-8389.

Lis, J. T. (1980). Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol* **65**, 347-353.

Liu, W. T., Natori, T., Chang, K. S. y Wu, A. M. (1977). Reverse transcriptase of foamy virus. Purification of the enzymes and immunological identification. *Arch Virol* **55**, 187-200.

- Lombardi, V. C., Ruscetti, F. W., Das Gupta, J., Pfost, M. A., Hagen, K. S., Peterson, D. L., Ruscetti, S. K., Bagni, R. K., Petrow-Sadowski, C., Gold, B., Dean, M., Silverman, R. H. y Mikovits, J. A. (2009). Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science* **326**, 585-589.
- Loussert-Ajaka, I., Chaix, M. L., Korber, B., Letourneur, F., Gomas, E., Allen, E., Ly, T. D., Brun-Vezinet, F., Simon, F. y Saragosti, S. (1995). Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol* **69**, 5640-5649.
- Loussert-Ajaka, I., Ly, T. D., Chaix, M. L., Ingrand, D., Saragosti, S., Courouce, A. M., Brun-Vezinet, F. y Simon, F. (1994). HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet* **343**, 1393-1394.
- Lu, C. y Erickson, H. P. (1997). Expression in Escherichia coli of the thermostable DNA polymerase from Pyrococcus furiosus. *Protein Expr Purif* **11**, 179-184.
- Lu, K., Heng, X. y Summers, M. F. (2011). Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. *J Mol Biol* **410**, 609-633.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A. y Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from Pyrococcus furiosus. *Gene* **108**, 1-6.
- Lwatula, C., Garforth, S. J. y Prasad, V. R. (2012). Lys66 residue as a determinant of high mismatch extension and misinsertion rates of HIV-1 reverse transcriptase. *FEBS J* **279**, 4010-4024.
- Malboeuf, C. M., Isaacs, S. J., Tran, N. H. y Kim, B. (2001). Thermal effects on reverse transcription: improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis. *Biotechniques* **30**, 1074-1078, 1080, 1082, passim.
- Mandal, D., Dash, C., Le Grice, S. F. y Prasad, V. R. (2006). Analysis of HIV-1 replication block due to substitutions at F61 residue of reverse transcriptase reveals additional defects involving the RNase H function. *Nucleic Acids Res* **34**, 2853-2863.
- Mansky, L. M., Le Rouzic, E., Benichou, S. y Gajary, L. C. (2003). Influence of reverse transcriptase variants, drugs, and Vpr on human immunodeficiency virus type 1 mutant frequencies. *J Virol* **77**, 2071-2080.

Mattila, P., Korpela, J., Tenkanen, T. y Pitkanen, K. (1991). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase--an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* **19**, 4967-4973.

Margolis, D. M. (2010). Mechanisms of HIV latency: an emerging picture of complexity. *Curr HIV/AIDS Rep* **7**, 37-43.

Mariani, V. L. y Shuker, S. B. (2003). Identification of the RT-RH/IN cleavage site of HTLV-I. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 268-270.

Martín-Hernández, A. M., Gutiérrez-Rivas, M., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (1997). Mismatch extension fidelity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases with amino acid substitutions affecting Tyr115. *Nucleic Acids Res* **25**, 1383-1389.

Matamoros, T., Kim, B. y Menéndez-Arias, L. (2008). Mechanistic insights into the role of Val75 of HIV-1 reverse transcriptase in misinsertion and mismatch extension fidelity of DNA synthesis. *J Mol Biol* **375**, 1234-1248.

Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F. y Kunkel, T. A. (2000). Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase- $\epsilon$ . *Nature* **404**, 1011-1013.

Mauclere, P., Loussert-Ajaka, I., Damond, F., Fagot, P., Souquieres, S., Monny Lobe, M., Mbopi Keou, F. X., Barre-Sinoussi, F., Saragosti, S., Brun-Vezinet, F. y Simon, F. (1997). Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *AIDS* **11**, 445-453.

McCulloch, S. D. y Kunkel, T. A. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res* **18**, 148-161.

Menéndez-Arias, L., Abrahá, A., Quinones-Mateu, M. E., Mas, A., Camarasa, M. J. y Arts, E. J. (2001). Functional characterization of chimeric reverse transcriptases with polypeptide subunits of highly divergent HIV-1 group M and O strains. *J Biol Chem* **276**, 27470-27479.

Menéndez-Arias, L. (2002). Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **71**, 91-147.

Menéndez-Arias, L. (2008). Mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Virus Res* **134**, 124-146.

Menéndez-Arias, L. (2009). Mutation rates and intrinsic fidelity of retroviral reverse transcriptases. *Viruses* **1**, 1137-1165.

Menéndez-Arias, L. (2011). Evidence and controversies on the role of XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Rev Med Virol* **21**, 3-17.

Menéndez-Arias, L. (2013). Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: Overview and recent developments. *Antiviral Res* **98**, 93-120.

Mizrahi, V., Brooksbank, R. L. y Nkabinde, N. C. (1994). Mutagenesis of the conserved aspartic acid 443, glutamic acid 478, asparagine 494, and aspartic acid 498 residues in the ribonuclease H domain of p66/p51 human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase. Expression and biochemical analysis. *J Biol Chem* **269**, 19245-19249.

Moser, M. J., DiFrancesco, R. A., Gowda, K., Klingele, A. J., Sugar, D. R., Stocki, S., Mead, D. A. y Schoenfeld, T. W. (2012). Thermostable DNA polymerase from a viral metagenome is a potent RT-PCR enzyme. *PLoS One* **7**, e38371.

Ndongwe, T. P., Adediji, A. O., Michailidis, E., Ong, Y. T., Hachiya, A., Marchand, B., Ryan, E. M., Rai, D. K., Kirby, K. A., Whatley, A. S., Burke, D. H., Johnson, M., Ding, S., Zheng, Y. M., Liu, S. L., Kodama, E., Delviks-Frankenberry, K. A., Pathak, V. K., Mitsuya, H., Parniak, M. A., Singh, K. y Sarafianos, S. G. (2012). Biochemical, inhibition and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* **40**, 345-359.

Nie, Z., Bergeron, D., Subbramanian, R. A., Yao, X. J., Checroune, F., Rougeau, N. y Cohen, E. A. (1998). The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J Virol* **72**, 4104-4115.

North, T. W., Hansen, G. L., Zhu, Y., Griffin, J. A. y Shih, C. K. (1994). Expression of reverse transcriptase from feline immunodeficiency virus in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 388-391.

Nowak, E., Potrzebowski, W., Konarev, P. V., Rausch, J. W., Bona, M. K., Svergun, D. I., Bujnicki, J. M., Le Grice, S. F. y Nowotny, M. (2013). Structural analysis of monomeric retroviral reverse transcriptase in complex with an RNA/DNA hybrid. *Nucleic Acids Res* **41**, 3874-3887.



- O'Neil, P. K., Sun, G., Yu, H., Ron, Y., Dougherty, J. P. y Preston, B. D. (2002). Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis. *J Biol Chem* **277**, 38053-38061.
- Okello, J. B., Rodriguez, L., Poinar, D., Bos, K., Okwi, A. L., Bimenya, G. S., Sewankambo, N. K., Henry, K. R., Kuch, M. y Poinar, H. N. (2010). Quantitative assessment of the sensitivity of various commercial reverse transcriptases based on armored HIV RNA. *PLoS One* **5**, e13931.
- Operario, D. J., Reynolds, H. M. y Kim, B. (2005). Comparison of DNA polymerase activities between recombinant feline immunodeficiency and leukemia virus reverse transcriptases. *Virology* **335**, 106-121.
- Operario, D. J., Balakrishnan, M., Bambara, R. A. y Kim, B. (2006). Reduced dNTP interaction of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase promotes strand transfer. *J Biol Chem* **281**, 32113-32121.
- Oude Essink, B. B., Back, N. K. y Berkhout, B. (1997). Increased polymerase fidelity of the 3TC-resistant variants of HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* **25**, 3212-3217.
- Palm, P., Schleper, C., Arnold-Ammer, I., Holz, I., Meier, T., Lottspeich, F. y Zillig, W. (1993). The DNA-dependent RNA-polymerase of *Thermotoga maritima*; characterisation of the enzyme and the DNA-sequence of the genes for the large subunits. *Nucleic Acids Res* **21**, 4904-4908.
- Pandey, R. C., Datta, D., Mukerjee, R., Srinivasan, A., Mahalingam, S. y Sawaya, B. E. (2009). HIV-1 Vpr: a closer look at the multifunctional protein from the structural perspective. *Curr HIV Res* **7**, 114-128.
- Paprotka, T., Delviks-Frankenberry, K. A., Cingoz, O., Martinez, A., Kung, H. J., Tepper, C. G., Hu, W. S., Fivash, M. J., Jr., Coffin, J. M. y Pathak, V. K. (2011). Recombinant origin of the retrovirus XMRV. *Science* **333**, 97-101.
- Pathak, V. K. y Temin, H. M. (1990). Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts, and hypermutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6019-6023.

- Peeters, M., Gueye, A., Mboup, S., Bibollet-Ruche, F., Ekaza, E., Mulanga, C., Ouedrago, R., Gandji, R., Mpele, P., Dibanga, G., Koumare, B., Saidou, M., Esu-Williams, E., Lombart, J. P., Badombena, W., Luo, N., Vanden Haesevelde, M. y Delaporte, E. (1997). Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* **11**, 493-498.
- Perbal, B. (2008). Avian myeloblastosis virus (AMV): only one side of the coin. *Retrovirology* **5**, 49.
- Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D. L. y Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**, 871-872.
- Popovic, M., Flomenberg, N., Volkman, D. J., Mann, D., Fauci, A. S., Dupont, B. y Gallo, R. C. (1984). Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. *Science* **226**, 459-462.
- Prabakaran, P., Dimitrov, A. S., Fouts, T. R. y Dimitrov, D. S. (2007). Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors. *Adv Pharmacol* **55**, 33-97.
- Preston, B. D., Poiesz, B. J. y Loeb, L. A. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**, 1168-1171.
- Quiñones-Mateu, M. E., Soriano, V., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (1997). Characterization of the reverse transcriptase of a human immunodeficiency virus type 1 group O isolate. *Virology* **236**, 364-373.
- Quivy, V., De Walque, S. y Van Lint, C. (2007). Chromatin-associated regulation of HIV-1 transcription: implications for the development of therapeutic strategies. *Subcell Biochem* **41**, 371-396.
- Ramírez, B. C., Simon-Loriere, E., Galetto, R. y Negroni, M. (2008). Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res* **134**, 64-73.
- Rausch, J. W., Lener, D., Miller, J. T., Julias, J. G., Hughes, S. H. y Le Grice, S. F. (2002). Altering the RNase H primer grip of human immunodeficiency virus reverse transcriptase modifies cleavage specificity. *Biochemistry* **41**, 4856-4865.
- Ren, J., Bird, L. E., Chamberlain, P. P., Stewart-Jones, G. B., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (2002). Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the

mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14410-14415.

Rezende, L. F., Drosopoulos, W. C. y Prasad, V. R. (1998a). The influence of 3TC resistance mutation M184I on the fidelity and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* **26**, 3066-3072.

Rezende, L. F., Curr, K., Ueno, T., Mitsuya, H. y Prasad, V. R. (1998b). The impact of multidideoxynucleoside resistance-conferring mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on polymerase fidelity and error specificity. *J Virol* **72**, 2890-2895.

Robb, C. W., Orihuela, C. J., Ekkelenkamp, M. B. y Niesel, D. W. (2001). Identification and characterization of an in vivo regulated D15/Oma87 homologue in *Shigella flexneri* using differential display polymerase chain reaction. *Gene* **262**, 169-177.

Roberts, J. D., Bebenek, K. y Kunkel, T. A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**, 1171-1173.

Roberts, J. D., Preston, B. D., Johnston, L. A., Soni, A., Loeb, L. A. y Kunkel, T. A. (1989). Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro. *Mol Cell Biol* **9**, 469-476.

Rodes, B., de Mendoza, C., Rodgers, M., Newell, A., Jimenez, V., Lopez-Brugada, R. M. y Soriano, V. (2005). Treatment response and drug resistance in patients infected with HIV type 1 group O viruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 602-607.

Rodgers, D. W., Gamblin, S. J., Harris, B. A., Ray, S., Culp, J. S., Hellmig, B., Woolf, D. J., Debouck, C. y Harrison, S. C. (1995). The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1222-1226.

Rho, H. M., Poiesz, B., Ruscetti, F. W. y Gallo, R. C. (1981). Characterization of the reverse transcriptase from a new retrovirus (HTLV) produced by a human cutaneous T-cell lymphoma cell line. *Virology* **112**, 355-360.

Rubinek, T., Bakhanashvili, M., Taube, R., Avidan, O. y Hizi, A. (1997). The fidelity of 3' misinsertion and mispair extension during DNA synthesis exhibited by two drug-resistant mutants of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 with Leu74-->Val and Glu89-->Gly. *Eur J Biochem* **247**, 238-247.

- Rucker, E., Munch, J., Wildum, S., Brenner, M., Eisemann, J., Margolis, L. y Kirchhoff, F. (2004). A naturally occurring variation in the proline-rich region does not attenuate human immunodeficiency virus type 1 nef function. *J Virol* **78**, 10197-10201.
- Sabunciyan, S., Mandelberg, N., Rabkin, C. S., Yolken, R. y Viscidi, R. (2011). No difference in antibody titers against xenotropic MLV related virus in prostate cancer cases and cancer-free controls. *Mol Cell Probes* **25**, 134-136.
- Sano, S., Yamada, Y., Shinkawa, T., Kato, S., Okada, T., Higashibata, H. y Fujiwara, S. (2012). Mutations to create thermostable reverse transcriptase with bacterial family A DNA polymerase from *Thermotoga petrophila* K4. *J Biosci Bioeng* **113**, 315-321.
- Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Das, K., Tuske, S., Birktoft, J. J., Ilankumaran, P., Ramesha, A. R., Sayer, J. M., Jerina, D. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2002). Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *EMBO J* **21**, 6614-6624.
- Sarafianos, S. G., Das, K., Tantillo, C., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Whitcomb, J. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2001). Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J* **20**, 1449-1461.
- Satterfield, B. C., Garcia, R. A., Jia, H., Tang, S., Zheng, H. y Switzer, W. M. (2011). Serologic and PCR testing of persons with chronic fatigue syndrome in the United States shows no association with xenotropic or polytropic murine leukemia virus-related viruses. *Retrovirology* **8**, 12.
- Sauter, K. B. y Marx, A. (2006). Evolving thermostable reverse transcriptase activity in a DNA polymerase scaffold. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 7633-7635.
- Schable, C., Zekeng, L., Pau, C. P., Hu, D., Kaptue, L., Gurtler, L., Dondero, T., Tsague, J. M., Schochetman, G., Jaffe, H. y et al. (1994). Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group O infections. *Lancet* **344**, 1333-1334.
- Schlaberg, R., Choe, D. J., Brown, K. R., Thaker, H. M. y Singh, I. R. (2009). XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16351-16356.
- Shah, F. S., Curr, K. A., Hamburgh, M. E., Parniak, M., Mitsuya, H., Arnez, J. G. y Prasad, V. R. (2000). Differential influence of nucleoside analog-resistance mutations K65R and L74V on the overall mutation rate and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **275**, 27037-27044.

Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A. y Crabtree, G. R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-205.

Silverman, A. P., Garforth, S. J., Prasad, V. R. y Kool, E. T. (2008). Probing the active site steric flexibility of HIV-1 reverse transcriptase: different constraints for DNA- versus RNA-templated synthesis. *Biochemistry* **47**, 4800-4807.

Simmons, G., Glynn, S. A., Komaroff, A. L., Mikovits, J. A., Tobler, L. H., Hackett, J., Jr., Tang, N., Switzer, W. M., Heneine, W., Hewlett, I. K., Zhao, J., Lo, S. C., Alter, H. J., Linnen, J. M., Gao, K., Coffin, J. M., Kearney, M. F., Ruscetti, F. W., Pfof, M. A., Bethel, J., Kleinman, S., Holmberg, J. A. y Busch, M. P. (2011). Failure to confirm XMRV/MLVs in the blood of patients with chronic fatigue syndrome: a multi-laboratory study. *Science* **334**, 814-817.

Singh, I. R. (2010). Detecting retroviral sequences in chronic fatigue syndrome. *Viruses* **2**, 2404-2408.

Skasko, M., Weiss, K. K., Reynolds, H. M., Jamburuthugoda, V., Lee, K. y Kim, B. (2005). Mechanistic differences in RNA-dependent DNA polymerization and fidelity between murine leukemia virus and HIV-1 reverse transcriptases. *J Biol Chem* **280**, 12190-12200.

Sluis-Cremer, N., Arion, D., Kaushik, N., Lim, H. y Parniak, M. A. (2000). Mutational analysis of Lys65 of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem J* **348 Pt 1**, 77-82.

Sluis-Cremer, N., Sheen, C. W., Zelina, S., Torres, P. S., Parikh, U. M. y Mellors, J. W. (2007). Molecular mechanism by which the K70E mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 48-53.

Soriano, V., Gutierrez, M., Garcia-Lerma, G., Aguilera, O., Mas, A., Bravo, R., Perez-Labad, M. L., Baquero, M. y Gonzalez-Lahoz, J. (1996). First case of HIV-1 group O infection in Spain. *Vox Sang* **71**, 66.

Stuke, A. W., Ahmad-Omar, O., Hoefer, K., Hunsmann, G. y Jentsch, K. D. (1997). Mutations in the SIV env and the M13 lacZa gene generated in vitro by reverse transcriptases and DNA polymerases. *Arch Virol* **142**, 1139-1154.

- Switzer, W. M., Jia, H., Hohn, O., Zheng, H., Tang, S., Shankar, A., Bannert, N., Simmons, G., Hendry, R. M., Falkenberg, V. R., Reeves, W. C. y Heneine, W. (2010). Absence of evidence of xenotropic murine leukemia virus-related virus infection in persons with chronic fatigue syndrome and healthy controls in the United States. *Retrovirology* **7**, 57.
- Tang, G. Q., Anand, V. S. y Patel, S. S. (2011). Fluorescence-based assay to measure the real-time kinetics of nucleotide incorporation during transcription elongation. *J Mol Biol* **405**, 666-678.
- Taube, R., Loya, S., Avidan, O., Perach, M. y Hizi, A. (1998). Reverse transcriptase of mouse mammary tumour virus: expression in bacteria, purification and biochemical characterization. *Biochem J* **329** ( Pt 3), 579-587.
- Taylor, B. S. y Hammer, S. M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* **359**, 1965-1966.
- Tebit, D. M., Lobritz, M., Lalonde, M., Immonen, T., Singh, K., Sarafianos, S., Herchenroder, O., Krausslich, H. G. y Arts, E. J. (2010). Divergent evolution in reverse transcriptase (RT) of HIV-1 group O and M lineages: impact on structure, fitness, and sensitivity to nonnucleoside RT inhibitors. *J Virol* **84**, 9817-9830.
- Temin, H. M. y Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-1213.
- Thomas, D. A. y Furman, P. A. (1991). Purification and kinetic characterization of equine infectious anemia virus reverse transcriptase. *Biochem Biophys Res Commun* **180**, 1365-1371.
- Turner, B. G. y Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**, 1-32.
- Tuske, S., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Naeger, L. K., White, K. L., Miller, M. D., Gibbs, C. S., Boyer, P. L., Clark, P., Wang, G., Gaffney, B. L., Jones, R. A., Jerina, D. M., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2004). Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 469-474.
- Upadhyay, A. K., Talele, T. T. y Pandey, V. N. (2010). Impact of template overhang-binding region of HIV-1 RT on the binding and orientation of the duplex region of the template-primer. *Mol Cell Biochem* **338**, 19-33.

Urisman, A., Molinaro, R. J., Fischer, N., Plummer, S. J., Casey, G., Klein, E. A., Malathi, K., Magi-Galluzzi, C., Tubbs, R. R., Ganem, D., Silverman, R. H. y DeRisi, J. L. (2006). Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog* **2**, e25.

Verhaegh, G. W., de Jong, A. S., Smit, F. P., Jannink, S. A., Melchers, W. J. y Schalken, J. A. (2011). Prevalence of human xenotropic murine leukemia virus-related gammaretrovirus (XMRV) in Dutch prostate cancer patients. *Prostate* **71**, 415-420.

Weber, J. y Grosse, F. (1989). Fidelity of human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase in copying natural DNA. *Nucleic Acids Res* **17**, 1379-1393.

Weiss, K. K., Bambara, R. A. y Kim, B. (2002). Mechanistic role of residue Gln151 in error prone DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT). Pre-steady state kinetic study of the Q151N HIV-1 RT mutant with increased fidelity. *J Biol Chem* **277**, 22662-22669.

Weiss, K. K., Chen, R., Skasko, M., Reynolds, H. M., Lee, K., Bambara, R. A., Mansky, L. M. y Kim, B. (2004). A role for dNTP binding of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in viral mutagenesis. *Biochemistry* **43**, 4490-4500.

Weiss, K. K., Isaacs, S. J., Tran, N. H., Adman, E. T. y Kim, B. (2000). Molecular architecture of the mutagenic active site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: roles of the beta 8-alpha E loop in fidelity, processivity, and substrate interactions. *Biochemistry* **39**, 10684-10694.

Werner, S. y Wohrl, B. M. (2000). Asymmetric subunit organization of heterodimeric Rous sarcoma virus reverse transcriptase alphabeta: localization of the polymerase and RNase H active sites in the alpha subunit. *J Virol* **74**, 3245-3252.

Wilén, C. B., Tilton, J. C. y Doms, R. W. (2012). HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**

Wilson, W., Braddock, M., Adams, S. E., Rathjen, P. D., Kingsman, S. M. y Kingsman, A. J. (1988). HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell* **55**, 1159-1169.

Wisniewski, M., Palaniappan, C., Fu, Z., Le Grice, S. F., Fay, P. y Bambara, R. A. (1999). Mutations in the primer grip region of HIV reverse transcriptase can increase replication fidelity. *J Biol Chem* **274**, 28175-28184.

- Wohrl, B. M., Krebs, R., Thrall, S. H., Le Grice, S. F., Scheidig, A. J. y Goody, R. S. (1997). Kinetic analysis of four HIV-1 reverse transcriptase enzymes mutated in the primer grip region of p66. Implications for DNA synthesis and dimerization. *J Biol Chem* **272**, 17581-17587.
- Wong-Staal, F., Shaw, G. M., Hahn, B. H., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Markham, P., Redfield, R. y Gallo, R. C. (1985). Genomic diversity of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* **229**, 759-762.
- Wu, W., Henderson, L. E., Copeland, T. D., Gorelick, R. J., Bosche, W. J., Rein, A. y Levin, J. G. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein reduces reverse transcriptase pausing at a secondary structure near the murine leukemia virus polypurine tract. *J Virol* **70**, 7132-7142.
- Yasukawa, K., Konishi, A. y Inouye, K. (2010a). Effects of organic solvents on the reverse transcription reaction catalyzed by reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukemia virus. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 1925-1930.
- Yasukawa, K., Mizuno, M., Konishi, A. y Inouye, K. (2010b). Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis. *J Biotechnol* **150**, 299-306.
- Yasukawa, K., Nemoto, D. y Inouye, K. (2008). Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. *J Biochem* **143**, 261-268.
- Yoon, V., Fridkis-Hareli, M., Munisamy, S., Lee, J., Anastasiades, D. y Stevceva, L. (2010). The GP120 molecule of HIV-1 and its interaction with T cells. *Curr Med Chem* **17**, 741-749.
- Yu, H. y Goodman, M. F. (1992). Comparison of HIV-1 and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase fidelity on RNA and DNA templates. *J Biol Chem* **267**, 10888-10896.
- Zhao, R. Y., Elder, R. T. y Bukrinsky, M. (2007). Interactions of HIV-1 viral protein R with host cell proteins. *Adv Pharmacol* **55**, 233-260.
- Zhou, D., Chung, S., Miller, M., Grice, S. F. y Wlodawer, A. (2012). Crystal structures of the reverse transcriptase-associated ribonuclease H domain of xenotropic murine leukemia-virus related virus. *J Struct Biol* **177**, 638-645.



Zinnen, S., Hsieh, J. C. y Modrich, P. (1994). Misincorporation and mispaired primer extension by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Biol Chem* **269**, 24195-24202.